

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ – UFPA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR –
PPGNBC
NÍVEL DOUTORADO

TATIANE CRISTINA MOTA

CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS DA
DROGA ANTIMALÁRICA ARTESUNATO EM LINFÓCITOS HUMANOS

BELÉM

2015

TATIANE CRISTINA MOTA

CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS DA
DROGA ANTIMALÁRICA ARTESUNATO EM LINFÓCITOS HUMANOS

Tese apresentada como requisito para a obtenção de título de Doutor (a) pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, área de concentração Biologia Celular da Universidade Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia.

BELÉM

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Mota, Tatiane Cristina, 1982-

Caracterização in vitro dos efeitos genotóxicos e citotóxicos da droga antimalárica artesunato em linfócitos humanos / Tatiane Cristina Mota. - 2015.

Orientador: Marcelo de Oliveira Bahia.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2015.

1. Antimaláricos. 2. Linfócitos. 3. Toxicologia genética. 4. Stress oxidativo. I. Título.

CDD 22. ed. 616.9362061

TATIANE CRISTINA MOTA

CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS DA
DROGA ANTIMALÁRICA ARTESUNATO EM LINFÓCITOS HUMANOS

Tese apresentada como requisito para a obtenção de título de Doutor (a) pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, área de concentração Biologia Celular da Universidade Federal do Pará.

Aprovada em: 23 / 10 / 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Araújo Guimarães – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) / UEPA.

Prof^a. Dr^a. Adriana Costa Guimarães – Instituto de Ciências Biológicas (ICB) / UFPA.

Prof. Dr. Carlos Alberto Machado da Rocha – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará (IFPA).

Prof^a. Dr^a. Carolina Rosal Teixeira de Souza (Suplente) – Instituto de Ciências Biológicas (ICB) / UFPA.

BELÉM

2015

Dedico este trabalho à minha querida mãe Rosilene Mota e ao meu irmão Lucas Mota, pelo amor, apoio incondicional e felicidade que me proporcionam por tê-los ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por iluminar meus caminhos e por me dar forças para superar as dificuldades e para vencer todos os desafios que a vida nos impõe.

À minha querida mãe Rosilene Mota e aos meus familiares (tias, tios, primas e primos queridos) por estarem sempre ao meu lado me apoiando em todas as minhas decisões.

Ao meu querido irmão Lucas Mota, que contagia a minha vida com a sua alegria, seu cuidado comigo e com seu amor, e que a cada dia que passa se torna uma pessoa cada vez mais incrível.

Ao meu orientador, professor Dr. Marcelo de Oliveira Bahia, pela paciência, por suas observações, pelas críticas, pela amizade, pela compreensão, pelo apoio, e por ter me aceitado como aluna em seu laboratório em um momento muito difícil da minha vida.

Ao professor Dr. Rommel Mario Rodriguès Burbano, pelo apoio, pelas críticas, pelas dicas e pelos momentos de descontração vividos ao seu lado na rotina diária do laboratório.

Ao MSc. Plínio Cardoso, mais conhecido como tio Plínio (presidente da GDP), por ter me recebido super bem no laboratório de Citogenética Humana (LCH), pelo seu apoio, pela amizade, pelo companheirismo e por ter me ajudado muito logo que cheguei no LCH.

Ao professor Dr. André Khayat pela compreensão, pelos esclarecimentos, pela paciência e pelas dicas que com certeza contribuíram para este trabalho.

À professora Dr^a Adriana Guimarães, Drica para os íntimos, pela amizade, pelo carinho demonstrado pela minha pessoa, pelas dicas, pelas críticas e por ter me ajudado bastante em vários momentos, tanto no que diz respeito a assuntos do laboratório, como por exemplo, no FISH, mas também em outras situações.

À minha grande amiga Tarcyane Barata Garcia, pelo companheirismo, pela compreensão, pela alegria, pelo carinho, pelas brincadeiras, pelo apoio diário nesta caminhada, por me ajudar com a imunofluorescência logo que voltou da Alemanha, mesmo tendo várias coisas para fazer; e por sempre estar ao meu lado nas horas em que mais preciso. Amiga você é um presente de Deus na minha vida, é mais que uma amiga, é uma irmã.

À minha amiga Tarcymara Barata Garcia, pelo companheirismo, pela força, pela amizade e por todos os momentos de alegria e descontração em que passamos juntas.

À minha grande amiga Sione Sousa, pelo carinho, pela força, pelo companheirismo, pela compreensão e por saber que posso sempre contar com o seu apoio para tudo.

Às minhas amigas Deyse Livia, Carla Gama, Lorena Almeida e Alessandra Miranda, que com o jeito alegre e despojado de ser conquistaram minha amizade e admiração, e com as quais pretendo manter este laço de amizade.

À todos os amigos e companheiros de Laboratório (Loreninha, Regianne, Bruno, Dani, Henrique, Felipe, Luiz, Adrielle, Ingrid, Emerson, Leilane, Laine, Priscilla, Aline, Taíssa, Lorenona, Diego, Hellem, Amanda, Camila, Gal, Leopoldo, Carlos Rocha, Glorita, Fernando) pelas conversas, pelas brincadeiras, pela alegria e pelos momentos de descontração. E um em especial às minhas queridas amigas e colaboradoras, Laís Bonfim, Adrhyan Portilho e Camila Pinto, pelo apoio, pelo carinho, pela amizade e por terem me ajudado em vários momentos nesse trajeto.

“Bem aventurados os que encontram a sabedoria e aqueles que adquirem conhecimento”.

Provérbios, 3: 13.

RESUMO

A malária é uma das patologias infecto-contagiosas mais graves no mundo, apresentando distribuição geográfica bastante extensa em zonas tropicais. Seu tratamento é baseado na administração de drogas específicas, como, a artemisinina e seus derivados: artesunato, o qual será objeto deste estudo, e artemeter. O artesunato, é um composto semi-sintético derivado da artemisinina, substância extraída da planta chinesa *Artemisia annua* L. Apesar da ampla utilização do artesunato na terapia antimalárica, e de haver fortes evidências de que outros antimaláricos como, a partenina e a cloroquina, apresentem efeitos genotóxicos *in vitro*; ainda hoje são escassos os trabalhos que demonstrem seus efeitos genotóxicos em linfócitos humanos. Em estudos prévios realizados no laboratório de citogenética humana, foi demonstrado que o artesunato induz danos genotóxicos e citotóxicos ao DNA de linfócitos humanos em cultura. Apesar destes achados, os mecanismos indutores de tais efeitos não foram devidamente caracterizados devido a limitações das técnicas utilizadas. Assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar *in vitro* os efeitos genotóxicos e citotóxicos do artesunato em linfócitos de sangue periférico humano utilizando técnicas como FISHMN, ensaios de estresse oxidativo e imunocitoquímica por imunofluorescência. Pretendeu-se através do uso de tais técnicas, elucidar os mecanismos responsáveis pelos efeitos do artesunato no DNA de linfócitos humanos. A partir dos resultados encontrados no presente estudo foi possível inferir que o artesunato induz a formação de ROS e outros radicais livres e que estas substâncias estão causando danos no DNA dos linfócitos humanos em cultura. Assim, as células com o DNA danificado, não sendo capazes de reverter tal condição, ativam a apoptose pelas vias extrínseca e intrínseca.

Palavras-chave: artesunato. linfócitos. genotoxicidade. citotoxicidade. estresse oxidativo

ABSTRACT

Malaria is one of the most serious infectious disease in the world, with quite extensive geographic distribution in tropical areas. Its treatment is based on administration of specific drugs, as artemisinin and its derivatives: artesunate, which will be the subject of this study, and artemether. The artesunate is a semi-synthetic compound derived from artemisinin, a substance extracted from the Chinese plant *Artemisia annua* L. Despite the widespread use of artesunate in antimalarial therapy and the strong evidences that other antimalarials such as partenin and chloroquine present genotoxic effects *in vitro*; there are few studies that demonstrate artesunate genotoxic effects in human lymphocytes. In previous studies carried out in laboratory human cytogenetics, it was shown that artesunate induces cytotoxic and genotoxic effects in human lymphocytes *in vitro*. Despite these findings, the mechanisms of these effects have not been adequately characterized due to limitations of the techniques used. This study aimed to assess *in vitro* the cytotoxic and genotoxic effects of artesunate on human peripheral blood lymphocytes using assays such as FISHMN, oxidative stress and immunocytochemistry by immunofluorescence. We aimed through these tools elucidate the mechanisms responsible for the effects of artesunate in DNA of human lymphocytes. The results found in this study suggest that the artesunate induces the formation of ROS and other free radicals and that these substances are causing DNA damage in human lymphocytes in culture. Thus cells with damaged DNA, not being able to reverse this condition, activate apoptosis through the extrinsic and intrinsic pathways.

Keywords: artesunate. lymphocytes. genotoxicity. cytotoxicity. oxidative stress

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1 - Distribuição de áreas afetadas pela malária no mundo.....	2
FIGURA 2 - Distribuição de áreas de risco de infecção por malária no Brasil em 2014	4
FIGURA 3 - Mecanismo de ação das artemisininas nas hemáceas humanas	8
FIGURA 4 - <i>Artemisia annua L.</i> , planta da qual é extraída a droga antimalárica artemisinina.....	9
FIGURA 5 - Esquema mostrando a obtenção de células binucleadas micronucleadas após exposição a um agente mutagênico e a distinção da origem do micronúcleo por FISHMN.....	11
FIGURA 6 - Desenho esquemático da estrutura molecular da droga antimalárica artesunato.....	12
FIGURA 7 - Via extrínseca de ativação da apoptose	17
FIGURA 8 - Via intrínseca de ativação da apoptose	18
FIGURA 9 - As múltiplas atividades de <i>TP53</i> de acordo com o estado celular	19
FIGURA 10 - Desenho esquemático mostrando a produção de células sanguíneas com destaque para os linfócitos.....	20

FIGURA 11 - Redução do NBT ao metabólito formazana por ânions radicais superóxidos	25
FIGURA 12 - Conversão do óxido nítrico em seus metabólitos estáveis	26
FIGURA 13 - Desenho esquemático ilustrando a origem do micronúcleo.....	28
FIGURA 14 - Fotomicrografias ilustrando diversos aspectos de células binucleadas que se enquadram nos critérios de análise.....	30
FIGURA 15 - Fotomicrografias ilustrando células binucleadas micronucleadas.....	31
FIGURA 16 - Fotomicrografias ilustrando células binucleadas e mononucleada com PNP e BN	31
FIGURA 17 - Fotomicrografias ilustrando células multinucleadas	32
FIGURA 18 - Fotomicrografia ilustrando padrões de células binucleadas analisadas pelo método de FISHMN e visualizadas em microscópio de fluorescência	35
FIGURA 19 - Desenho esquemático mostrando o princípio da técnica de imunofluorescência	36
FIGURA 20 - Efeito do artesunato nos níveis de ânion superóxido em cultura de linfócitos humanos analisado pelo ensaio do NBT no período de 1 h	40
FIGURA 21 - Efeito do artesunato nos níveis totais de nitrito em cultura de linfócitos humanos analisado pelo teste do Nitrito no período de 1 h	41

FIGURA 22 - Efeito do artesunato em cultura de linfócitos humanos analisados pelo teste do micronúcleo	42
FIGURA 23 - Efeito do artesunato na indução de PNP em cultura de linfócitos humanos analisado pelo teste do micronúcleo	43
FIGURA 24 - Efeito do artesunato na indução de BN em cultura de linfócitos humanos analisado pelo teste do micronúcleo	43
TABELA 1 - Efeito do artesunato no índice de divisão nuclear (IDN) de linfócitos humanos analisado pelo teste do micronúcleo	44
FIGURA 25 - Fotomicrografias de células de linfócitos humanos obtidas no presente estudo após o tratamento com o artesunato e a realização do teste do micronúcleo convencional	44
FIGURA 26 - Efeito clastogênico e aneugênico do artesunato em cultura de linfócitos humanos analisado pelo ensaio do FISHMN	45
FIGURA 27 - Fotomicrografia de células de linfócitos humanos obtidas no presente estudo após o tratamento com o artesunato, realização do teste de FISHMN e visualização em microscópio de fluorescência	46
FIGURA 28 - Efeito do artesunato na expressão da CASP 8 em cultura de linfócitos humanos analisado por imunocitoquímica	47
FIGURA 29 - Micrografias de células de linfócitos humanos obtidas no presente estudo por imunocitoquímica de fluorescência, mostrando o efeito do artesunato na expressão da CASP 8 após 24 h de tratamento	48

FIGURA 30 - Efeito do artesunato na expressão da CASP 9 em cultura de linfócitos humanos analisado por imunocitoquímica	49
FIGURA 31 - Efeito do artesunato na expressão da Citocromo C em cultura de linfócitos humanos analisado por imunocitoquímica	49
FIGURA 32 - Micrografias de células de linfócitos humanos obtidas no presente estudo por imunocitoquímica de fluorescência, mostrando o efeito do artesunato na expressão da CASP 9 após 24 h de tratamento	50
FIGURA 33 - Micrografias de células de linfócitos humanos obtidas no presente estudo por imunocitoquímica de fluorescência, mostrando o efeito do artesunato na expressão do Citocromo C após 24 h de tratamento	51

LISTA DE SIGLAS

- OMS - Organização Mundial de Saúde
- ARS - Artesunato
- TCA - Terapia de Combinação das Artemisininas
- AC - Aberração Cromossômica
- MN - Micronúcleo
- DNA - Ácido Desoxirribonucléico
- ROS - Espécies Reativas de Oxigênio
- QSH - Quinghaosu (outro nome dado às artemisininas)
- FISHMN - Hibridação Fluorescente *In Situ* para Micronúcleo
- C-MN - Micronúcleo Centrômero-Negativo
- C+MN - Micronúcleo Centrômero-Positivo
- NFκB - Factor Nuclear Kappa B
- NO - Óxido Nítrico
- NOS - Óxido Nítrico Sintase
- GSH - Glutathiona
- SOD - Superóxido Dismutase
- CAT - Catalase
- GPx - Glutathiona Peroxidase
- CASP8 - Caspase-8
- CASP9 - Caspase-9
- CASP3 - Caspases-3
- CASP6 - Caspase-6
- CASP7 - caspase-7
- APAF-1 - Fator de Ativação de Proteases Associado à Apoptose 1
- NBT - Nitroblue Tetrazolium
- TCLE - Termo de Consentimento Livre e Eclarecido
- FBS - Fetal Bovine Serum (Soro Bovino Fetal)

DMSO - Dimetilsulfóxido

CtB - Citocalasina B

IDN - Índice de Divisão Nuclear

PNP - Ponte Nucleoplasmática

BN - Broto Nuclear

RNA - Ácido Ribonucléico

SSC – Saline-Sodium Citrate Buffer (Tampão Salino de Citrato de Sódio)

DAPI - 4',6 – Diamidino - 2 – Phenylindole

FITC - Fluorescein Isothiocyanate (Isotiocianato de Fluoresceína)

TRITC - Tetramethylrhodamine Isothiocyanate (Isotiocianato Tetrametilrodamina)

PBS - Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato)

BSA - Bovine Serum Albumin (Albumina Sérica Bovina)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Malária	2
1.2 Artemisinina e Genotoxicidade de Drogas Antimaláricas	6
1.3 Artesunato	11
1.4 Radicais Livres e Estresse Oxidativo	13
1.5 Apoptose	16
1.6 Cultura de Linfócitos Humano como Modelo de Estudo	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Obtenção da Amostra e Delineamento Experimental	23
3.2 Cultura de Linfócitos Isolados	23
3.3 Tratamentos	24
3.4 Avaliação do Estresse Oxidativo	25
3.5 Teste do Micronúcleo	27
3.6 Hibridação Fluorescente <i>In Situ</i> Para Micronúcleo (FISHMN)	32
3.7 Análise da Expressão de CASP 8, CASP 9 e Citocromo C por Imunofluorescência	36
3.8 Análise Estatística	39
4 RESULTADOS	39
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXO 1	72
ANEXO 2	74

1 INTRODUÇÃO

Doenças infectantes como a malária, febre amarela, dengue, dentre outras, há muito tempo estão presentes na vida do homem (COIMBRA, 1987). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a malária é uma das patologias infecto-contagiosas mais graves no mundo, apresentando distribuição geográfica bastante extensa em zonas tropicais, onde a temperatura e a umidade favorecem o desenvolvimento dos vetores (WHO, 2008).

Esta doença é encontrada expressivamente na Região Amazônica, mais precisamente nos estados que compõem a Amazônia legal (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) (OLIVEIRA *et al*, 2009), com destaque para o estado do Pará (PA), que em 1996 foi o mais afetado pela malária no Brasil, seguido por Rondônia (RO) e Amazonas (AM) (OPS/PAHO/WHO, 1997).

Dados atuais de junho de 2015 publicados pela Secretaria de Vigilância em saúde (SVS) do ministério da saúde (MS) demonstraram que o Pará já aparece em sexto lugar entre os nove estados da Amazônia legal acometidos por malária, apresentando 227 casos; e deixando o lugar de líder em prevalência para o estado do Amazonas, o qual no mesmo período apresentou 4.474 casos (MS, 2015). Desta forma, mesmo com os avanços no tratamento e com a redução de casos de malária em nosso estado, ainda assim, esta doença continua sendo motivo de preocupação em nosso território, uma vez que o Pará se encontra em área com adjacências endêmicas, o que o torna, portanto, uma área de risco, justificando a importância de estudos sobre esta doença em nossa unidade federativa.

O tratamento da malária é baseado principalmente na administração de drogas específicas, como por exemplo, as artemisininas e seus derivados: artesunato (ARS) e artemeter. A artemisinina é uma lactona sesquiterpênica, extraída da planta *Artemisia annua* L., que ainda é muito pouco estudada quanto

aos seus efeitos genotóxicos (BOARETO *et al*, 2008; WHITE, 2008).

Dentro deste contexto, torna-se de grande importância o estudo de drogas antimaláricas no estado do Pará, uma vez que a incidência de malária é grande nesta área (OLIVEIRA *et al*, 2009), o que expõe a população a um grave problema de saúde pública, uma vez que danos genotóxicos eventualmente provocados por medicamentos podem aumentar o risco de carcinogênese em pacientes que fazem uso dos mesmos (NATARAJAN, 1993).

1.1 MALÁRIA

A malária é uma das parasitoses mais sérias e difundidas no mundo (Figura 1), acometendo um grande número de pessoas ao ano, o que conseqüentemente a torna responsável por uma das maiores causas de mortalidade e morbidade em regiões endêmicas (WHO, 2008).

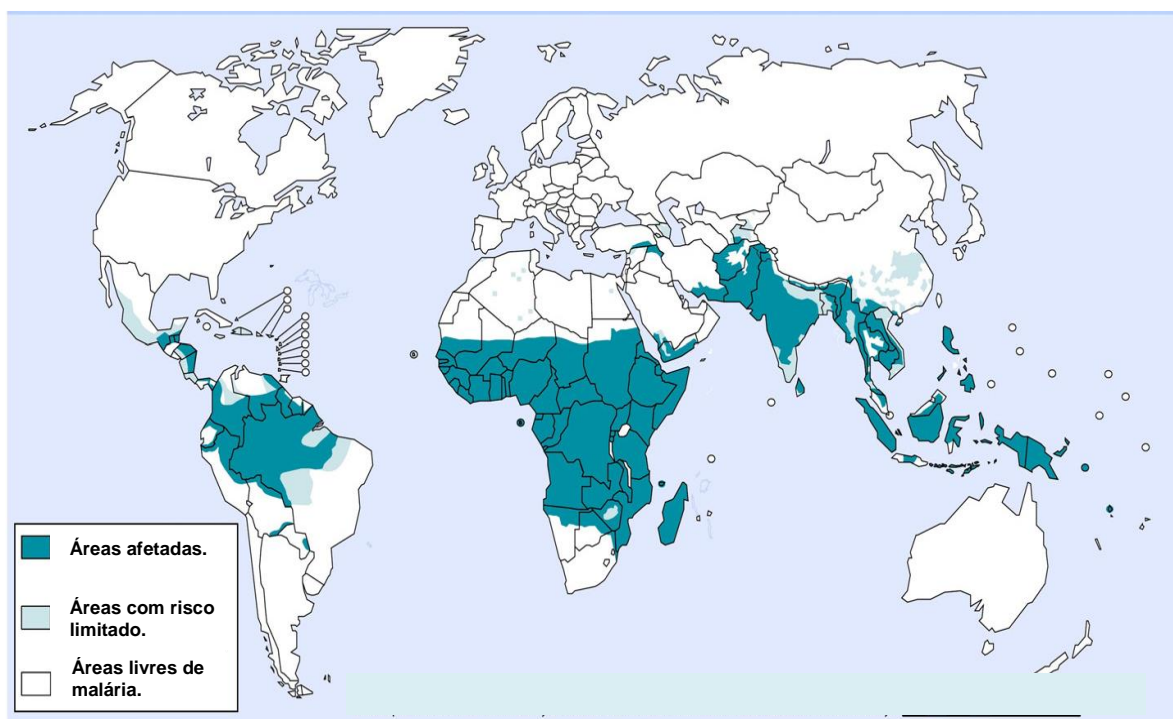


Figura 1: Distribuição de áreas afetadas pela malária no mundo (WHO, 2008).

É uma parasitose causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, pertencentes à família Plasmodiidae, ordem Eucoccidiidae, subordem Haemosporinae e filo Apicomplexa. Na natureza, existem cerca de 172 espécies de plasmódio, incluindo parasitas de primatas, roedores, entre outros. Destas espécies, apenas cinco são parasitas do homem: *Plasmodium (Plasmodium) vivax*, *Plasmodium (Plasmodium) malarie*, *Plasmodium (Laverania) falciparum*, *Plasmodium (Plasmodium) ovale* e *Plasmodium knowlesi*; sendo que apenas as três primeiras estão presentes em território brasileiro (LEVINE, 1988; MONTEIRO *et al.*, 2013).

De acordo com Bruce-Chwatt (1985) são encontradas várias formas de malária quanto à espécie de plasmódio: *P. vivax*, e *P. ovale*, responsáveis pela malária terçã benigna; *P. malarie*, associado a forma quartã, com distribuição geográfica nas regiões tropicais e subtropicais; e por fim, o *P. falciparum*, causador da forma terçã maligna. Dentre estes parasitas, o *Plasmodium falciparum*, além de ser o agente causador da forma mais severa da malária, também é o parasita mais resistente ao tratamento com drogas antimaláricas (WHO, 2003), sendo responsável por pelo menos um milhão de mortes de crianças ao ano (HALDAR; MOHANDAS, 2009).

Segundo dados da OMS, a malária já era considerada como uma das maiores preocupações para a saúde pública em muitos países, especialmente os do Terceiro Mundo, onde se destaca o Brasil, o qual notificou em 1996 o maior número de casos da doença (426.510) (OPS/PAHO/WHO, 1997).

O Brasil é considerado uma região endêmica de malária, sendo que 99% dos casos concentram-se na Amazônia Legal e 49 milhões de pessoas vivem em áreas de risco em território nacional (Figura 2) (MONTEIRO *et al.*, 2013). Em 2002, o país foi responsável por cerca de 40,5 % dos 960.000 casos notificados nas Américas (PAHWO, 2002), no entanto, em 2011, constatou-se redução de 40% na incidência

da doença no país (MONTEIRO *et al.*, 2013). Em 2012, 242.758 casos da doença foram confirmados (WHO, 2013).

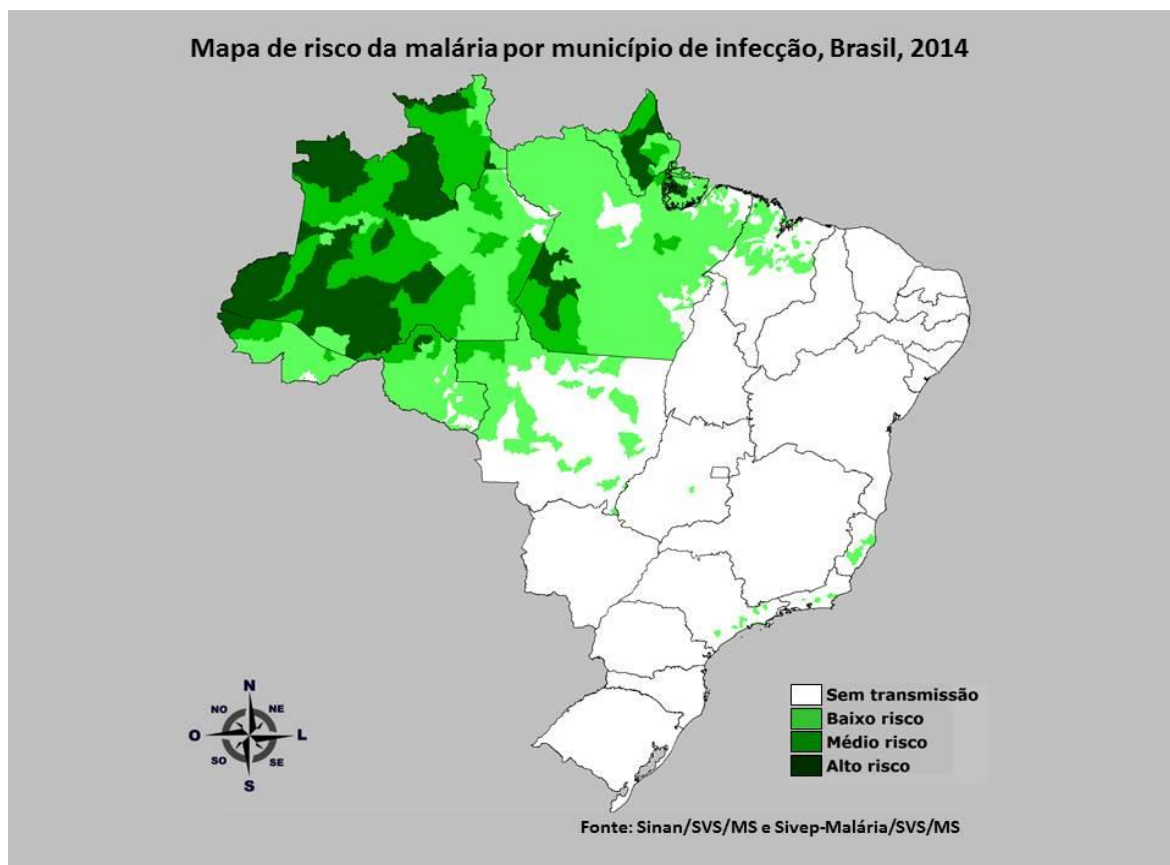


Figura 2: Distribuição de áreas de risco de infecção por malária no Brasil em 2014 (MS, 2015).

Quanto aos dados epidemiológicos mundiais, a malária em 2006 já totalizava aproximadamente 247 milhões de casos, sendo que mais de três bilhões de pessoas se encontravam em estado de risco (WHO, 2008). Em 2010, esta estimativa encontrava-se em torno dos 3,3 bilhões de pessoas com risco de adquirir a doença, havendo registro de 216 milhões de episódios. Já em 2013, esta estimativa subiu para 3,4 bilhões de pessoas em condição de risco de adquirir malária (WHO, 2013).

O tratamento da malária é baseado principalmente na Terapia de Combinação das Artemisininas (TCA), sendo o artesunato e o artemeter, derivados da artemisinina, drogas bastante eficazes nesta terapia, uma vez que apresentam ótima eficiência na destruição dos parasitas. Esta terapia é recomendada como primeira escolha nos casos de malária causada por *P. falciparum*, o parasita mais perigoso e resistente ao tratamento da doença. E devido tal eficácia, em 2012, 79 países e territórios haviam adotado as TCA como principal linha de tratamento no combate à malária causada por *P. falciparum* (WHO, 2013).

Em contrapartida, dados atuais afirmam que os parasitas tornaram-se resistentes às artemisininas em quatro países da sub-região do Mekong: Camboja, Myanmar, Tailândia e Vietnã. Na província de Pailin no Camboja, foi encontrada resistência a ambos componentes de múltiplos TCA, desta forma, para esses casos é feita uma terapia de observação direta usando uma combinação não baseada nas artemisininas, com a administração de atovacuona-proguanil. Porém, apesar das mudanças observadas na sensibilidade dos parasitas às artemisininas, as TCA continuam sendo eficazes no tratamento dos pacientes em outras regiões afetadas (WHO, 2013).

A literatura especializada tem demonstrado muitos estudos a respeito da avaliação citotóxica/genotóxica de medicamentos antimaláricos em geral, apesar disto, e a despeito das artemisininas serem utilizadas como drogas de primeira escolha no tratamento da malária, ainda não existem muitos trabalhos que demonstrem *in vitro* os mecanismos pelos quais os derivados das artemisininas (incluindo o artesunato, motivo de investigação deste trabalho) atuam nas células em geral. (BOARETO *et al*, 2008; WHITE, 2008). O presente trabalho pretende explorar tais mecanismos em diferentes contextos celulares.

1.2 ARTEMISININA E GENOTOXICIDADE DE DROGAS ANTIMALÁRICAS

É conhecido que populações humanas podem apresentar danos genéticos por exposição accidental, ocupacional ou ambiental a agentes mutagênicos químicos, físicos ou mesmo biológicos. Estes agentes podem interferir no adequado desenvolvimento da célula, causando danos em seu material genético (NATARAJAN, 1993).

Os danos no DNA induzidos por agentes mutagênicos podem ser reparados, porém, muitos deles podem levar à formação de alterações cromossômicas (AC), as quais podem ser estáveis ou não. As primeiras referem-se à danos como, translocações recíprocas e algumas aneuploidias, que não impedem a divisão e a proliferação celular; enquanto que as segundas, tais como, os cromossomos dicêntricos e em anel e as grandes deleções, normalmente são letais à célula. Em vista disso, diferentes alterações podem se acumular nas sucessivas divisões celulares e conseqüentemente produzir mutações em genes, os quais teriam um papel fundamental no processo de carcinogênese (LITTLE, 2000).

Os agentes químicos e físicos capazes de induzir a formação de AC são chamados de agentes clastogênicos, os quais podem ter seu potencial genotóxico/mutagênico detectado por vários testes, tais como: a análise de alterações cromossômicas em células metafásicas, o teste do micronúcleo (MN), o teste do cometa, o ensaio de Híbridação Fluorescente *In Situ* para Micronúcleo (FISHMN), entre outros (AL-SABATI *et al*, 1992; GUIMARÃES *et al*, 2003; MOVAJAGH *et al*, 2005).

Nos últimos anos, o arsenal de armas terapêuticas na campanha global para a erradicação da malária ganhou um enorme impacto com a utilização das artemisininas. A artemisinina e seus derivados (dihidroartemisinina, artesunato, artemeter e arteeter) têm sido extensivamente utilizados como drogas antimaláricas em vários lugares do mundo (BOARETO *et al*, 2008; WHITE, 2008).

Estas drogas são moléculas hidrofóbicas capazes de se difundir passivamente através das membranas biológicas; o que facilita os seus efeitos antimaláricos. Agem por meio do componente endoperóxido presente em sua estrutura molecular, com a conseqüente formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como, ânion radical superóxido e radicais hidroxila, induzindo desta forma, vários danos celulares. Sabe-se ainda, que na presença de ferro livre, a artemisinina e seus derivados podem se converter em um radical citotóxico, um agente alquilante altamente potente, capaz de induzir danos oxidativos diretos às células (EFFERTH *et al.*, 2003, 2004; FIRESTONE & SUNDAR, 2009; O'NEILL *et al.*, 2010).

Em vista disso, as artemisininas possuem a capacidade de destruir parasitas intra-eritrocitários da malária, prevenindo sua evolução para estágios patológicos mais avançados. Após penetrar o eritrócito, o parasita endocita a molécula de hemoglobina, removendo aminoácidos essenciais presentes em suas globinas, os quais são importantes para o seu crescimento. Em seguida, ocorre a liberação do grupamento heme, o qual, na forma livre, torna-se bastante tóxico às membranas celulares, porém, o parasita apresenta um mecanismo de defesa contra essa citotoxicidade. Ele agrega o grupamento heme na forma de um composto denominado hemozoína, o qual é hidrossolúvel e não tóxico para as células; e desta forma o parasita consegue sobreviver. Porém, na presença de alguns antimaláricos, como as artemisininas, ocorre a formação de metabólitos com grande potencial redox (radicais livres), os quais são provenientes da reação entre a droga e o grupamento heme. Estes metabólitos promovem a catálise da membrana vacuolar do parasita, provocando a liberação de proteases no interior de seu citosol, o que conseqüentemente levará a autodestruição do mesmo (Figura 3) (BERMAN; ADAMS, 1997).

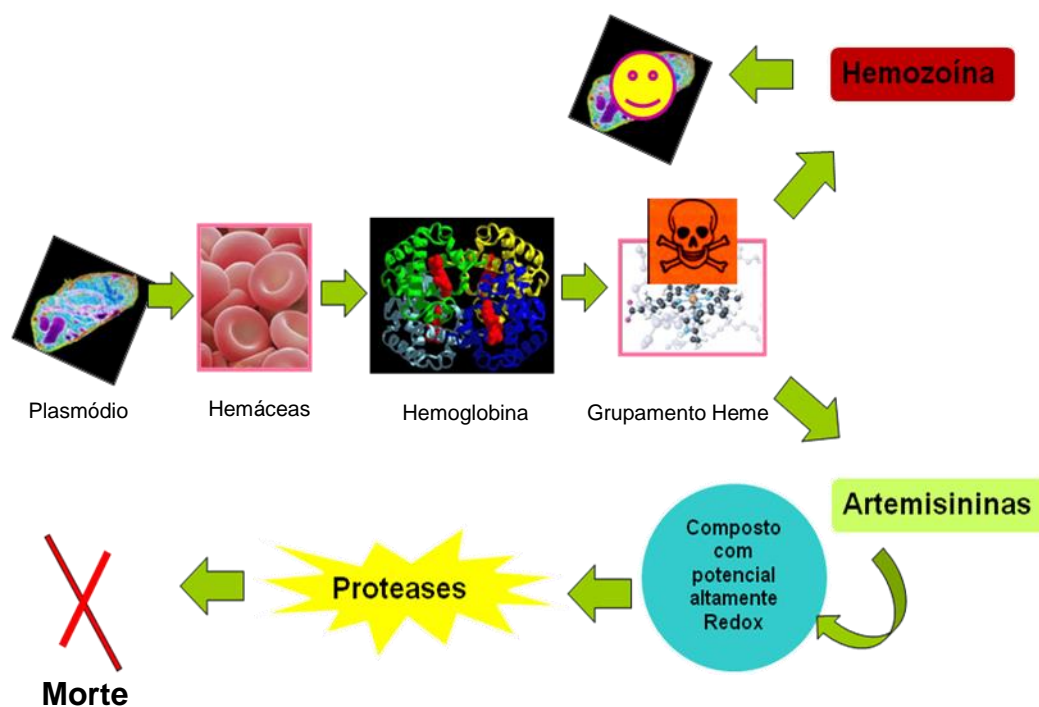


Figura 3: Mecanismo de ação das artemisininas nas hemácias humanas (MOTA, 2011).

A artemisinina, também conhecida como quinghaosu (QSH), é um composto natural extraído da planta chinesa *Artemisia annua* L. (Figura 4) (LIU *et al*, 1979). Esta substância foi isolada há mais de 60 anos por cientistas chineses que pesquisavam uma cura para a malária, sendo por muito tempo também utilizada no tratamento de febres e outras doenças (LIU *et al*, 1979; KLAYMAN, 1985). É considerada juntamente com seus derivados, uma lactona endoperóxida sesquiterpênica (LINDEGARDH *et al*, 2009), substância que segundo a literatura apresenta algumas evidências genotóxicas (BOARETO *et al*, 2008; WHITE, 2008).



Artemisia annua L.

Figura 4: *Artemisia annua L.*, planta da qual é extraída a droga antimalárica artemisinina (<http://images.google.com.br>).

Segundo He *et al.* (2010) os sesquiterpenos são substâncias que têm atraído grande interesse científico pelo fato de apresentarem atividades biológicas importantes como ação antifúngica e citotóxica, entre outras. Vasconcellos *et al.* (2007) sugeriram fortes evidências do efeito genotóxico das lactonas sesquiterpênicas, uma vez que verificaram que o composto 15-deoxigioiazensolida induz mutações em *Sacharomyces cerevisiae*. Outro exemplo diz respeito à partenina, uma lactona antimalárica que induz a formação de micronúcleos e de outras AC em linfócitos periféricos (RAMOS *et al.*, 2002).

Sabe-se, de acordo com Al-Zubairi *et al.* (2010), que o sesquiterpeno Zerumbona, fármaco bastante utilizado como antiinflamatório na medicina tradicional, induz um aumento significativo na frequência de MN em culturas temporárias de linfócitos. Outro exemplo do efeito genotóxico dos sesquiterpenos pode ser visto no trabalho de Burim *et al.* (2001), que ao estudarem o potencial clastogênico da centraterina em linfócitos humanos e camundongos, observaram efeito tanto na taxa de alterações cromossômicas quanto na frequência de trocas entre cromátides-irmãs.

Outras drogas antimaláricas clássicas, como a primaquina e a cloroquina, usadas no tratamento contra a malária provocada por *P. vivax*, têm demonstrado efeitos genotóxicos *in vitro* (FAROMBI, 2006). Chatterjee *et al.* (1998) observaram que estas drogas aumentam a frequência de AC e de trocas de material genético entre cromátides-irmãs de células da medula óssea de ratos.

Adicionalmente a estes achados, Krishnaja e Chauhan (2000) comprovaram atividade genotóxica em outro antimalárico, dihidroclorato de quinacrina. Segundo os resultados destes autores, esta substância induz a formação de aberrações cromossômicas (cromossomos dicêntricos, translocações e inversões) em cultura de linfócitos periféricos humanos.

Portanto, estudos de mutagenicidade com técnicas que sejam capazes de distinguir entre efeitos clastogênicos (causam alterações estruturais) e/ou aneugênicos (causam alterações numéricas), como, por exemplo, a técnica de FISHMN (que utiliza sondas pan-centroméricas, as quais marcam regiões conservadas dos centrômeros dos cromossomos) são de grande importância na avaliação dos possíveis efeitos genotóxicos de determinados fármacos. Através desta técnica é possível se fazer a distinção entre micronúcleos provenientes de fragmentos cromossômicos acêntricos (C-MN: micronúcleo centrômero-negativo), caracterizando o efeito clastogênico; e aqueles provenientes de cromossomos inteiros (C+MN: micronúcleo centrômero-positivo), o que irá caracterizar o efeito aneugênico (CHUNG *et al.*, 2002; WNUK *et al.*, 2009) (Figura 5).

De acordo com Kryscio *et al.* (2001), estudos baseados na avaliação genotóxica de minérios de urânio sugerem que baixas percentagens de C+MN podem representar importantes biomarcadores de instabilidade genômica e predisposição ao câncer. Estas constatações reforçam ainda mais a importância do presente estudo, uma vez que a artemisinina e seus derivados são as drogas de primeira escolha na terapia antimalárica, sendo, portanto, de grande relevância uma avaliação bem detalhada de seus efeitos no DNA das células em estudo.

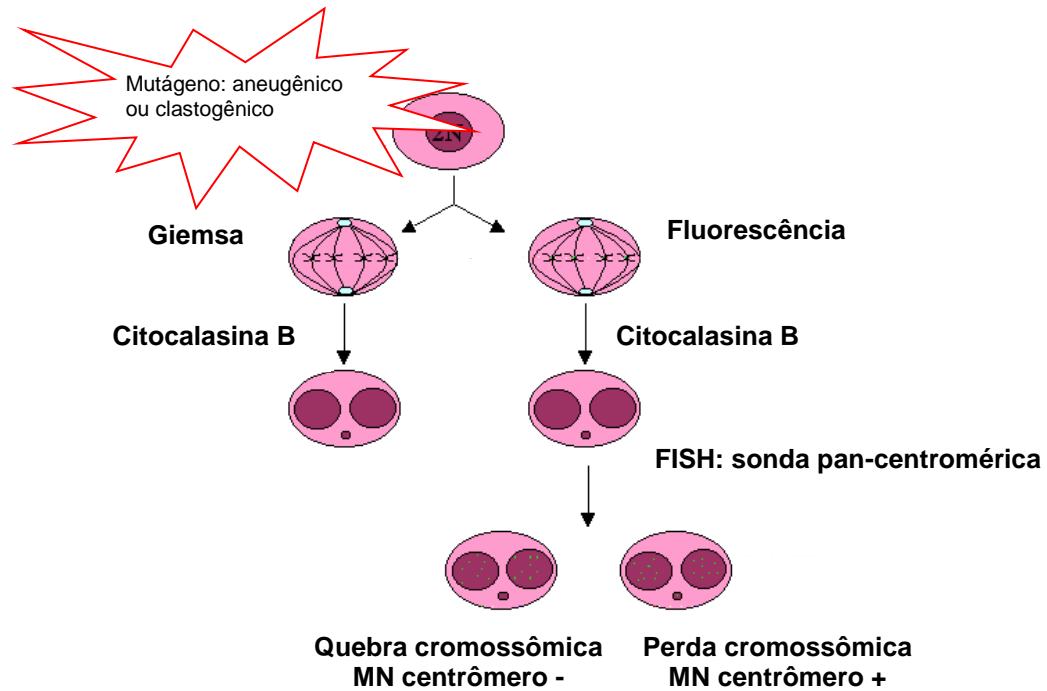


Figura 5: Esquema mostrando a obtenção de células binucleadas micronucleadas após exposição a um agente mutagênico e a distinção da origem do micronúcleo por FISHMN (<http://images.google.com.br>).

1.3 ARTESUNATO

O artesunato (Figura 6) é um derivado semi-sintético da artemisinina com grande aceitação no tratamento da malária (PRICE, 2000). É um fármaco bastante recomendado pela Organização Mundial de Saúde, uma vez que vários estudos clínicos com pacientes maláricos mostram que esta droga é bem tolerada durante o tratamento e apresenta poucos efeitos colaterais (HIEN *et al*, 1992).

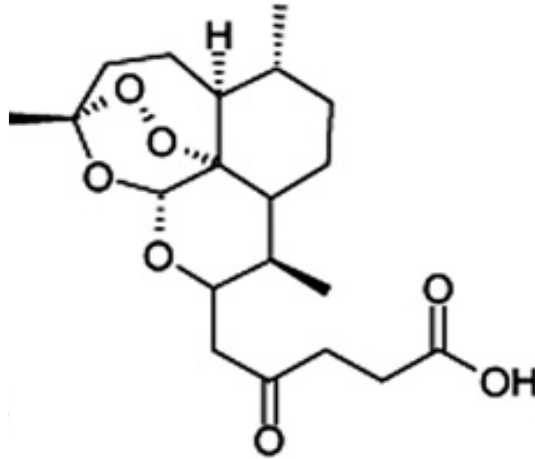


Figura 6: Desenho esquemático da estrutura molecular da droga antimalárica artesunato (KONKIMALLA *et al*, 2008).

De acordo com Arreesrisom *et al.* (2007), o artesunato age no parasita malárico 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. Contudo, Li *et al.* (2008) observaram que em altas concentrações, esta droga pode causar danos oxidativos ao DNA de células ovarianas de hamsters, e tais danos podem causar quebras de fita simples e dupla, apoptose, além de induzir neurotoxicidade.

Efferth *et al.* (2001) reportaram que além do seu bom efeito como antimalárico, o artesunato também tem demonstrado uma profunda 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 anti-neoplásica do artesunato contra células de neuroblastoma.

Embora a citotoxicidade do artesunato contra células tumorais tenha sido descoberta há aproximadamente três décadas (EFFERTH *et al*, 1996), os mecanismos moleculares pelos quais esta droga exerce sua atividade anti-neoplásica não estão bem elucidados (EFFERTH *et al*, 2007). Alguns estudos revelaram que o artesunato inibe a proliferação e induz apoptose em linhagens de

células de mieloma de rato (SP2/0), de forma dependente do tempo e da concentração, e sugerem que seu efeito na inibição do crescimento destas células pode estar sendo mediado pelo bloqueio da via de sinalização do fator NFκB (LI *et al.*, 2009).

Outra propriedade importante do artesunato está associada ao seu potente efeito inibitório contra certas viroses, tais como, o citomegalovírus humano e outros membros da família *Herpesviridae*; vírus da hepatite B, hepatite C e também da diarreia bovina, sendo ainda eficaz contra a esquistossomose (EFFERTH *et al.*, 2008). Investigações laboratoriais com artesunato demonstraram que ele é um bom agente contra trematodos, como *Eschinostoma caproni*, *Fasciola hepatica*, *Opisthorchis viverrini* e *Clonorchis sinensis* (KEISER *et al.*, 2006a; KEISER *et al.*, 2006b; XIAO *et al.*, 2008).

1.4 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

As Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) constituem um dos principais radicais livres celulares. As ROS são substâncias produzidas naturalmente durante o metabolismo celular, sendo seu excesso eliminado por sistemas antioxidantes bem elaborados. Desta forma, em baixas concentrações fisiológicas, as ROS não representam perigo à célula, pelo contrário, apresentam um papel importantíssimo na regulação de mecanismos moleculares fundamentais, tais como, a transdução de sinal ou ainda a expressão gênica, por meio do balanço redox celular (SEN, 1998; DRÖGE, 2002; KNOW *et al.*, 2003).

Outro radical livre importantíssimo biologicamente é o óxido nítrico (NO), um gás instável produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) a partir do aminoácido L-arginina. Este radical está envolvido em várias funções fisiológicas essenciais, como, por exemplo, atuando como vasodilatador, neurotransmissor, relaxante muscular e ainda participando da regulação imune (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Quando produzido em excesso, o NO pode reagir rapidamente com várias moléculas, como, o ácido úrico, proteínas, DNA, e ainda com outros radicais livres, como algumas ROS, podendo causar danos à célula. Neste contexto, a reação do NO com ânion radical superóxido (O_2^-), que é um radical livre, leva a formação de peroxinitrito, um composto extremamente reativo e tóxico para as células, capaz de nitrosilar resíduos de tirosina, levando a formação de proteínas modificadas ou com suas funções inibidas (MOSHAGE *et al*, 2009).

Apesar de todas as funções e benefícios fisiológicos dos radicais livres, sabe-se que em condições patológicas, como por exemplo, durante os processos de inflamação, metabolismo de xenobióticos, estresse ou liberação de altas concentrações de íons metálicos, a formação destes compostos pode exceder a capacidade protetora da célula, levando, portanto, ao estresse oxidativo. Esta condição de estresse pode ser resultado de uma variedade de fatores, dentre os quais podemos citar a depleção significativa de glutathione (GSH), um dos principais agentes antioxidantes intracelulares, que tem seus níveis diminuídos na presença de estresse oxidativo na tentativa de manter o estado redox da célula balanceado (KEHRER, 2000; CHATGILIALOGLU; O'NEILL, 2001; DRÖGE, 2002).

Desta forma, o estresse oxidativo pode ser definido como uma produção excessiva de ROS e outros radicais livres, como o NO, os quais em nível acima do normal, tornam-se descompensados em relação aos antioxidantes não-enzimáticos e às enzimas antioxidantes responsáveis pelos mecanismos de defesa oxidativa da célula. Portanto, uma alteração nos sistemas de defesa antioxidante levará ao estresse oxidativo, condição que poderá produzir uma série de danos celulares (NOH; HA, 2011).

Segundo Brezniceanu *et al.* (2008), o sistema de defesa antioxidante das células envolve tanto um mecanismo enzimático, por meio das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), quanto um mecanismo não-enzimático, que tem como um dos seus principais componentes, o

tripeptídeo glutationa. Estes mecanismos são de extrema importância para a manutenção dos níveis de ROS intracelular em estado fisiológico, e uma alteração neste sistema leva ao estresse.

Sabe-se que o estresse oxidativo pode afetar de forma danosa uma grande variedade de macromoléculas biológicas, tais como os ácidos graxos insaturados presentes na bicamada lipídica, o DNA, entre outras. A ação destes radicais livres na molécula de DNA é de grande interesse para estudos que avaliam os efeitos genotóxicos de agentes químicos, como o desenvolvido no presente projeto; físicos e biológicos; uma vez que os danos induzidos nesta molécula podem causar uma série de eventos prejudiciais à célula, inclusive neoplasias (BASU *et al*, 2001; KOCHIAN *et al*, 2005).

Os radicais livres, principalmente, o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), o mais reativo e lesivo radical conhecido, podem causar danos irreversíveis na molécula de DNA. O $\bullet\text{OH}$, pode atacar açúcares desoxirribose das moléculas de DNA, e ainda, reagir com bases purínicas (adenina e guanina) e pirimidínicas (timina, citosina e uracila), reagindo preferencialmente com a guanina, gerando 8-hidroxi ou 8-oxoguanina, os quais são metabólitos considerados mutagênicos. Como resultado destes eventos, o radical hidroxila induz a quebra da cadeia de DNA, ligações cruzadas entre as fitas, e ainda, modificações de bases nitrogenadas, o que poderá levar à mutações e apoptose (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Em contrapartida, como mecanismo de defesa, a célula com o estado redox alterado ativa vias que permitem uma resposta adaptativa a essa nova condição. Tal ativação depende da intensidade de ROS produzida. Desta forma, se a produção for moderada, são ativadas vias que levam à transcrição de genes promotores de sobrevivência, os quais irão codificar moléculas antioxidantes, moléculas antiapoptóticas (Bcl-2), dentre outras. Por outro lado, se muito intensa, ocorre a ativação de vias que levam ao processo de morte celular, podendo ser apoptose ou necrose (BOGLIOLO, 2009).

1.5 APOPTOSE

O termo apoptose refere-se a um tipo de morte celular programada que ocorre por mecanismos altamente organizados. Este fenômeno é um processo evolutivo bem conservado, sendo, portanto, essencial para o desenvolvimento do organismo, remodelamento tecidual, resposta imune, supressão tumoral, dentre outros (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997; HAJRA; LIU, 2004).

Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, dentre eles estão: danos ao DNA, níveis aumentados de ROS, ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, choque térmico, privação de fatores de crescimento e baixa quantidade de nutrientes (HENGARTNER, 2000).

De acordo com Nicholson e Thornberry (1997) e Hajra e Liu (2004) a morte por apoptose não induz resposta inflamatória ou imune, o que torna este tipo de morte o preferido na eliminação de células cancerígenas. Desta forma, a indução seletiva de apoptose em células cancerígenas tem sido considerada uma terapia promissora contra vários tipos de câncer.

Em seres humanos a apoptose pode ocorrer por duas vias: a extrínseca, ou via mediada por receptores de membrana e a intrínseca ou via mitocondrial, sendo que ambas utilizam a cascata enzimática das caspases (Figuras 7 e 8). A via extrínseca utiliza como principal componente a caspase-8 (CASP8), enquanto a via intrínseca tem como integrante chave a caspase-9 (CASP9). Ambas as vias convergem na utilização das caspases-3 (CASP3), caspase-6 (CASP6) e caspase-7 (CASP7) como caspases efetoras, as quais são responsáveis por eventos bastante típicos, tais como, fragmentação de DNA, condensação da cromatina, dentre outros (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997; HAJRA; LIU, 2004). Entre essas duas vias, está a proteína pro-apoptótica Bid, a qual age como uma molécula de transição entre elas, uma vez que após ser clivada pela caspase-8, induz a translocação de

proteínas pro-apoptóticas para a membrana mitocondrial, dentre as quais, está a proteína Bax (BILLEN *et al*, 2008).

A caspase-8 é um dos reguladores chave do processo apoptótico, participando de mecanismos de defesa de extrema importância na célula, como, por exemplo, contra a hiperproliferação e a tumorigênese. Mutações no gene que codifica esta enzima têm sido bastante relatadas por aumentar os riscos de câncer (COX *et al.*, 2007). Song *et al.* (2005) observaram em seus estudos que o gene da CASP8 encontra-se mutado em pacientes com câncer gástrico avançado. Neste mesmo trabalho foi demonstrado que as mutações neste gene diminuem a atividade da caspase-8 durante o processo apoptótico.

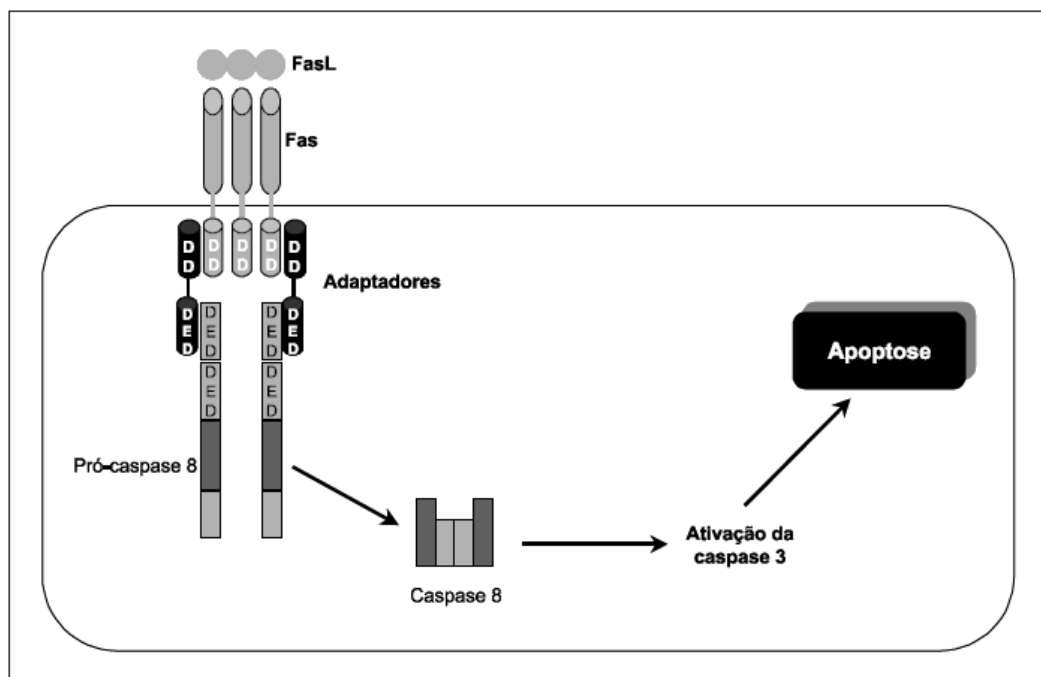


Figura 7: Via extrínseca de ativação da apoptose, em que DD: domínio de morte; DED: efetor do domínio de morte (GRIVICICH, 2007).

No que diz respeito à CASP9, sabe-se que se trata de uma das principais enzimas da via intrínseca, e sua ativação se dá por meio de danos mitocondriais, o que resulta na liberação da proteína carreadora de elétrons citocromo c. Após liberado no citosol, o citocromo c forma um complexo com a proteína adaptadora

denominada fator de ativação de proteases associado à apoptose 1 (APAF-1), o qual irá se ligar à procaspase-9 tornando-a ativa, e desencadeando conseqüentemente a cascata da CASP9 (ALBERT *et al.*, 2004; THEODOROPOULOS *et al.*, 2010).

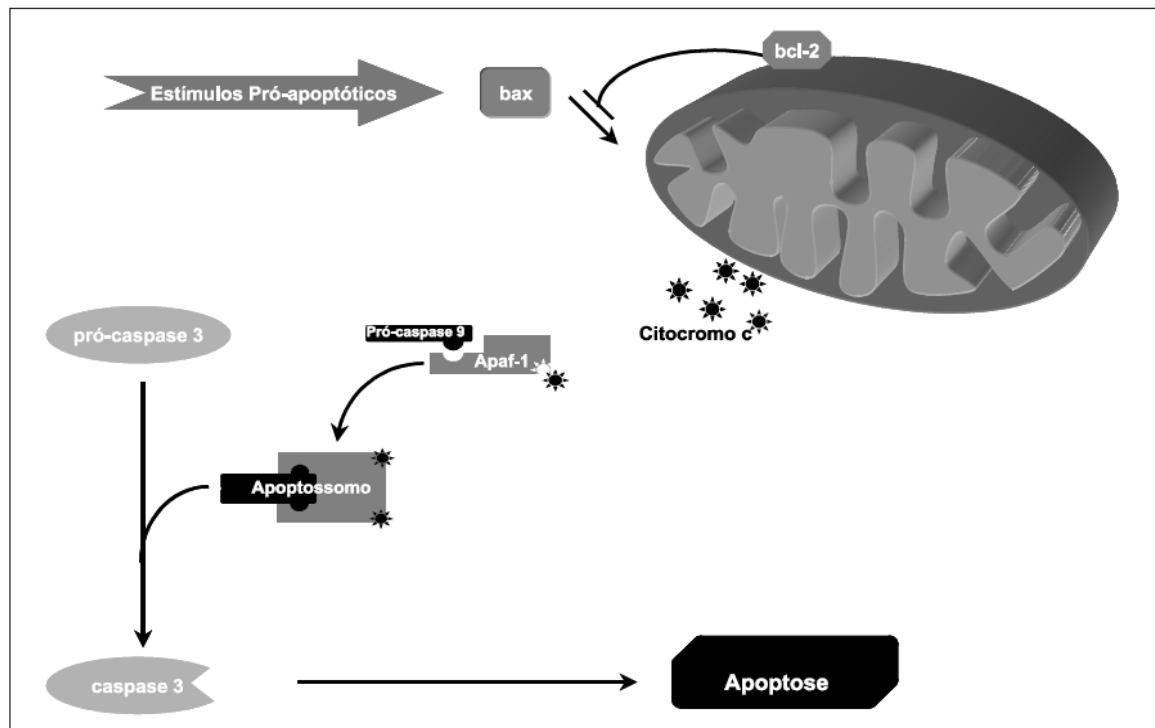


Figura 8: Via intrínseca de ativação da apoptose (GRIVICICH, 2007).

Outro gene envolvido na via intrínseca da apoptose é o *TP53*, o qual apresenta como suas principais atividades: a indução de parada no ciclo celular, principalmente na transição das fases G1/S quando na presença de danos ao DNA; ou então, o encaminhamento da célula para a apoptose, quando tais danos se tornam irreparáveis (BROWN *et al.*, 2009; LEVINE; OREN, 2009; POLAGER; GINSBERG, 2009; ZILFOU; LOWE, 2009).

Segundo Asai *et al.* (2011) o gene *TP53* é responsável por múltiplas funções na célula, podendo variar sua expressão de acordo com o estado celular (condições fisiológicas ou estado de estresse). Portanto, dependendo da natureza, nível ou

duração do sinal de estresse, *TP53* pode induzir uma variedade de respostas celulares. Assim, quando expresso em baixos níveis, sob condições fisiológicas, este gene assume um importante papel na homeostasia celular; em contrapartida, níveis aumentados de estresse, induzem um aumento na expressão de *TP53*, levando a célula conseqüentemente a entrar em apoptose (Figura 9).

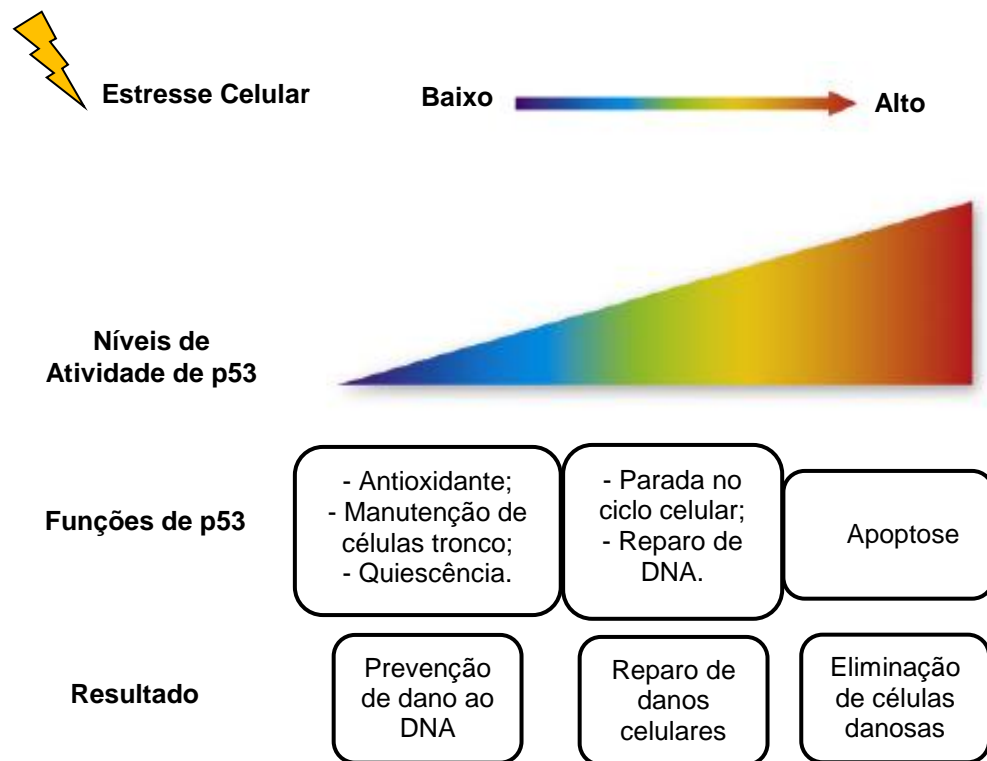


Figura 9: As múltiplas atividades de *TP53* de acordo com o estado celular (Adaptado de Asai *et al.*, 2011).

1.6 CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANO COMO MODELO DE ESTUDO

Os linfócitos são células responsáveis pela extraordinária especificidade das respostas imuno-adaptativas de nosso organismo. Como pode ser visto na figura 10, 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).

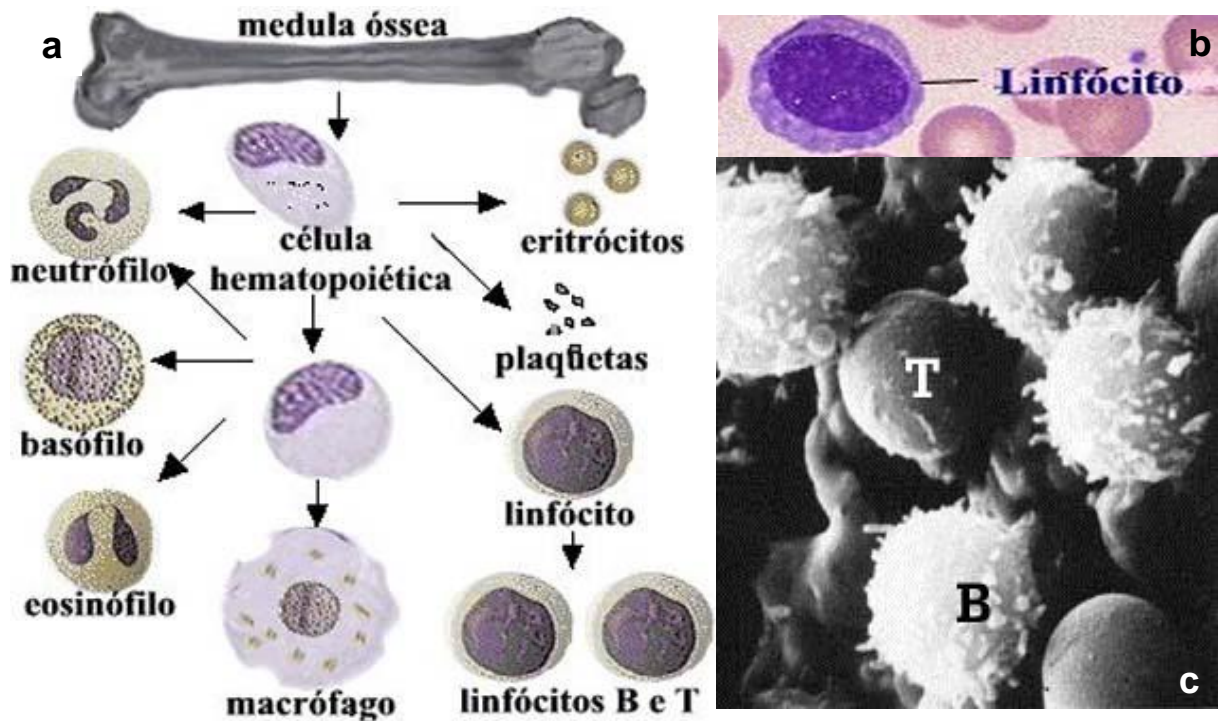


Figura 10: (a) Desenho esquemático mostrando a produção de células sangüíneas com destaque para os linfócitos; (b) observa-se uma fotomicrografia com um linfócito corado com Giemsa; e em (c), observa-se uma fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura evidenciando linfócitos do tipo T e B (<http://images.google.com.br>).

Devido a sua grande abundância na corrente sanguínea, os linfócitos tornaram-se um modelo *in vitro* bastante vantajoso 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 citadas acima justificam a ampla utilização das culturas celulares de linfócitos em estudos citogenéticos, tanto os clássicos (teste do micronúcleo, ensaio do cometa e alterações cromossômicas), quanto os moleculares (FISH), o que ressalta a utilidade destes modelos em estudos de genotoxicidade, como o aqui proposto.

Sendo assim, o presente projeto pretende caracterizar o potencial genotóxico e citotóxico do artesunato, uma vez que em estudos prévios realizados no laboratório de citogenética humana (MOTA *et al*. 2011) foi demonstrado que esta droga, um dos principais derivados da artemisinina, induz danos genotóxicos e citotóxicos ao DNA de linfócitos humanos em cultura, resultado este, constatado por ensaios clássicos de genotoxicidade e citotoxicidade.

Portanto, para elucidar os mecanismos responsáveis pelos efeitos do artesunato no DNA de linfócitos humanos de sangue periférico, utilizamos no presente estudo técnicas como FISHMN, detecção de estresse oxidativo e imunocitoquímica por imunofluorescência. A ação de tal droga no DNA deve ser esclarecida, uma vez que efeitos genotóxicos podem aumentar o risco de carcinogênese em pacientes submetidos ao tratamento com a mesma. A expectativa é de que os resultados obtidos neste projeto possam fornecer subsídios que colaborem no sentido de implementar estratégias de tratamento mais rígidas e multidisciplinares no controle da malária, com redução de risco de doenças secundárias, como, por exemplo, o câncer.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os efeitos genotóxicos e citotóxicos da droga antimalárica artesunato em cultura de células linfocitárias humanas provenientes de sangue periférico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Avaliar os níveis intracelulares de ânion radical superóxido (O_2^-) induzidos pelo artesunato em cultura de linfócitos periféricos humanos pelo ensaio do NBT (Nitroblue Tetrazolium);
- ❖ Avaliar a produção de nitrito induzida pelo artesunato em cultura de linfócitos periféricos humanos pelo método de Griess;
- ❖ Avaliar a frequência de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas, índice de divisão nuclear e brotos nucleares em cultura de linfócitos periféricos humanos tratados com diferentes concentrações de artesunato utilizando a técnica do micronúcleo convencional;
- ❖ Avaliar os possíveis efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos do artesunato em cultura de linfócitos periféricos humanos utilizando a técnica de Hibridação Fluorescente *In Situ* para Micronúcleo (FISHMN);
- ❖ Avaliar por imunocitoquímica de fluorescência o efeito do artesunato na expressão das proteínas CASP8 (via extrínseca da apoptose) e citocromo C e CASP9 (via intrínseca da apoptose).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As amostras de sangue periférico foram coletadas de 3 (três) indivíduos, entre homens e mulheres, os quais se enquadravam nos padrões exigidos para a realização de testes genotóxicos: ser adulto com idade entre 18 e 40 anos de ambos os sexos; não fumantes de mais de 4 cigarros ao dia; não portadores de doenças agudas ou crônicas graves; que não tenham recebido tratamento à base de medicamentos nos últimos dois meses; que não sejam fármaco-dependentes, que não bebam quantidades significativas de álcool (mais de 200 mL) ao dia e/ou com exposição ocupacional ou outras atividades que causem genotoxicidade. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal Pará (CEP-ICS/UFGA). Os voluntários foram entrevistados e forneceram consentimento escrito de participação no estudo através de um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 1). O sangue foi coletado com o auxílio de seringas descartáveis de 20 mL, devidamente heparinizadas para evitar a coagulação, e 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 realizada uma diluição na proporção de 1:1 em solução salina estéril 0,9 %. A amostra foi homogeneizada por inversão e submetida a uma nova diluição em Histopaque-[®]1077 na proporção de 3:1 (1 parte de Histopaque-[®]1077: 3 partes de sangue diluído), sendo primeiramente acrescentado o Histopaque 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 rpm por 30 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 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). Posteriormente, o material foi centrifugado a 1500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi coletado e descartado deixando-se 1 mL de conteúdo, o qual foi homogeneizado e completado com mais 4 mL de solução de Hanks, e em seguida levado novamente para centrifugação a 1500 rpm por 5 min. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado por inversão e as células ressuspensas em 0,5 mL de meio de cultura RPMI 1640 estéril, suplementado com 20 % de soro bovino fetal (FBS) 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 µL da suspensão de células + 10 µL de *azul de tripan* 4%) e a contagem das células realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer, que nos 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 acondicionada com 5 % de CO₂ e temperatura de 37°C.

3.3 TRATAMENTOS

O artesunato (CAS no. 88495-63-0) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) foi diluído em meio RPMI, e em seguida acrescentado às culturas para se obter concentrações finais de 0,5; 1 e 2 µg/mL. Tais concentrações foram determinadas de acordo com dados da literatura (VEERASUBRAMANIAN *et al*, 2006; KELTER *et al*, 2007).

3.4 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

3.4.1 Níveis Intracelulares de Ânion Radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pelo Ensaio do NBT (Nitroblue Tetrazolium) – Princípio da Técnica.

Este método é baseado na redução do NBT por ânions radicais superóxidos, formando um composto de coloração azulada denominado formazana, o qual é passível de quantificação em espectrofotometria ou em leitores de microplaca em um comprimento de onda entre 570 e 620 nm (Figura 11) (CHOI *et al*, 2006).

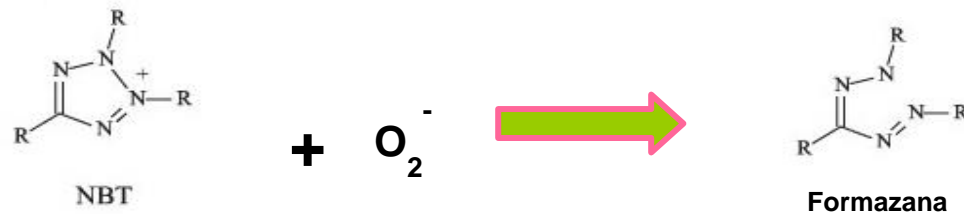


Figura 11: Redução do NBT ao metabólito formazana por ânions radicais superóxidos (MOTA, 2015).

3.4.1.1 Procedimento Experimental

Após 20 h em cultura, os linfócitos foram tratados com as concentrações de artesunato (1 e 2 $\mu\text{g/mL}$) que demonstraram maior efeito nos ensaios de genotoxicidade realizados anteriormente no laboratório de citogenética humana (MOTA *et al*, 2011). Vale ressaltar que além do tratamento com a droga, foi também realizado um controle negativo, em que as células foram expostas apenas ao meio de cultura. Após 1 h de tratamento, as células foram centrifugadas à 1000 rpm por 5 min. Posterior à centrifugação, o sobrenadante foi descartado e em seguida realizada uma lavagem em 1 mL de PBS 1 X. Após a lavagem, as células foram centrifugadas novamente à 1000 rpm por 5 min, o sobrenadante descartado e em seguida incubadas com 1 mL de 0,2 mg/mL de NBT (diluído em PBS 1X) por 2 h. Vale

ressaltar que a solução mãe de NBT (5mg/mL) foi diluída em PBS 1X à 1 % de DMSO. Após o período de incubação com NBT, as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 min e o sobrenadante descartado. Em seguida, foram adicionados às células 240 µL de KOH 2M seguido de 280 µL de DMSO 100 % e realizada uma dissociação mecânica. Posteriormente, as células foram agitadas delicadamente em vórtex por 10 min em temperatura ambiente. Após esse processo, as células foram transferidas para placas de 96 poços e os níveis de ânion radical superóxido quantificados em leitor de microplaca (BioTek ELX 800) em comprimento de onda de 570 nm.

3.4.2 Dosagem de Nitrito Total pelo Método de Griess – Princípio da Técnica.

O óxido nítrico (NO) é um radical de vida curta, ou seja, bastante instável, o qual reage rapidamente tanto com micromoléculas, como, por exemplo, o ácido úrico e a molécula antioxidante glutatona; quanto com macromoléculas, entre elas, proteínas e DNA. O princípio da técnica (Figura 12), se baseia no fato deste composto, além das interações citadas acima, também poder ser oxidado em metabólitos estáveis, tais como, nitrato e nitrito, sendo este último passível de quantificação em leitor de microplaca à 540 nm, quando em reação com uma solução reveladora denominada reagente de Griess, o qual é preparado a partir dos compostos N-(1-Naftil)-etilenodiamina 0,1 % em H₂O, e Sulfanilamida 1% em 5 % de H₃PO₄ na proporção de 1:1; formando um composto de coloração rosa (MOSHAGE *et al*, 2009).

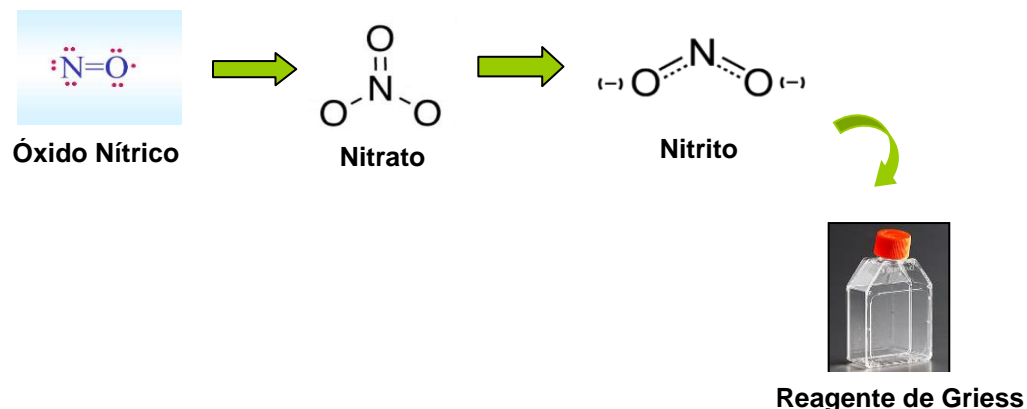


Figura 12: Conversão do óxido nítrico em seus metabólitos estáveis (nitrato e nitrito) (MOTA, 2015).

3.4.2.1 Procedimento Experimental

Semelhantemente ao ensaio do NBT, após 20 h em cultura, os linfócitos foram tratados com as concentrações de artesunato (1 e 2 $\mu\text{g/mL}$) pelos motivos citados anteriormente. Vale ressaltar que além do tratamento com a droga, foi também realizado um controle negativo, em que as células foram expostas apenas ao meio de cultura. Após 1 h de tratamento, as células foram centrifugadas à 1000 rpm por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado por inversão e as células ressuspendidas em 1 mL de triton X 100 0,3 % diluído em meio de cultivo. Posteriormente, as células foram transferidas para placas de 96 poços e reveladas com a solução de revelação denominada reagente de Griess (N-(1-Naftil)-etilenodiamina 0,1 % em H_2O , e Sulfanilamida 1% em 5 % de H_3PO_4 na proporção de 1:1) na proporção de 1:1 (1 parte da amostra: 1 parte do reagente de Griess). Após 10 min de reação, os níveis totais de nitrito foram quantificados em leitor de microplaca (BioTek ELX 800) em comprimento de onda de 540 nm. Ressalta-se ainda que além dos parâmetros experimentais com as amostras, uma curva de concentração de nitrito (0, 1, 2, 3, 5, 10, 25, 50, 75 e 100 μM) também foi realizada, no intuito de se estimar a concentração de nitrito em nossas amostras.

3.5 TESTE DO MICRONÚCLEO

3.5.1 Princípio da Técnica

Segundo Fenech (2000) e Chung *et al.* (2002) o MN constitui-se em uma pequena massa nuclear resultante de fragmentos cromossômicos acêntricos (C-MN: micronúcleo centrômero-negativo) ou de cromossomos inteiros (C+MN: micronúcleo centrômero-positivo) (Figura 13) que se atrasam em relação aos demais durante a anáfase; revelando assim a ação de agentes aneugênicos (causam alterações cromossômicas numéricas) e clastogênicos (causam 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. A distinção de micronúcleos originados a partir de cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos pode ser feita através da técnica de Híbridação Fluorescente *in Situ* para Micronúcleo (FISHMN) utilizando-se sondas pan-centroméricas (RABELLO-GAY *et al*, 1991; LINDBERG *et al*, 2008).

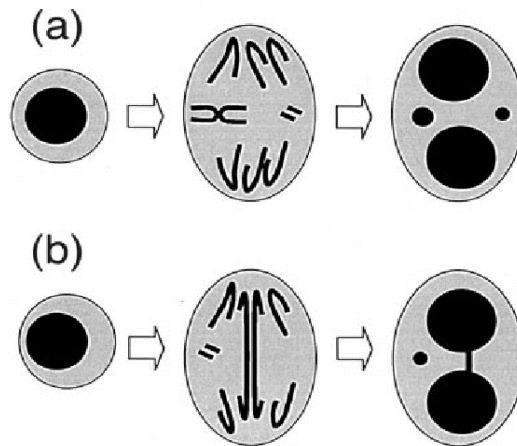


Figura 13: Desenho esquemático ilustrando a origem do micronúcleo. Em (a), dois micronúcleos, um proveniente de fragmento cromossômico acêntrico e outro oriundo de cromossomo inteiro; e em (b), a formação de uma ponte nucleoplasmática e de um micronúcleo a partir de fragmento cromossômico (adaptado de FENECH, 2000).

3.5.2 Procedimento Experimental

Após 20 h em cultura, os linfócitos foram tratados com as diferentes concentrações de artesunato (0,5; 1 e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Vale ressaltar que além do tratamento com a droga, foram realizados também um controle negativo, em que as células foram expostas apenas ao meio de cultura e um controle positivo com 0,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxorubicina, uma droga reconhecidamente genotóxica. Passadas 24 h do tratamento (44 h de incubação após o início da cultura), foi adicionado à cultura 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 28 h com CtB (72 h de incubação após o início da cultura), as células foram transferidas para tubos de centrífuga 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 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, foi centrifugado mais uma vez a 800 rpm por 5 min e o sobrenadante descartado deixando 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 aproximadamente 400 µL de suspensão no tubo para a preparação das lâminas. Para cada lâmina foram utilizadas de 3 a 4 gotas de suspensão celular, dependendo da quantidade de material. As lâminas foram secas à temperatura ambiente e coradas com Giemsa 3 % por 4 min. Por fim, a análise de diversos parâmetros como o micronúcleo convencional, o índice de divisão nuclear (IDN), a formação de pontes nucleoplasmáticas (PNP) e de brotos nucleares (BN) foi realizada em microscópio óptico de luz modelo L2000A BIOVAL em aumento de 1000 X. Parte da amostra também foi utilizada para a realização do teste de FISHMN, utilizando-se um mix de sondas centroméricas de marcação direta, com representantes de todos os cromossomos humanos (Cytocell aquarius), cuja análise foi realizada em microscópio de fluorescência modelo BX41 OLYMPUS em aumento de 100 X.

3.5.3 Critérios Para a Seleção das Células (Fenech, 2000) (Figura 14)

- Mil (1000) células binucleadas com membrana intacta;
- Núcleos intactos, com tamanhos aproximadamente iguais, mesmo padrão de coloração e dentro do limite citoplasmático;
- Células claramente distinguíveis das células adjacentes.

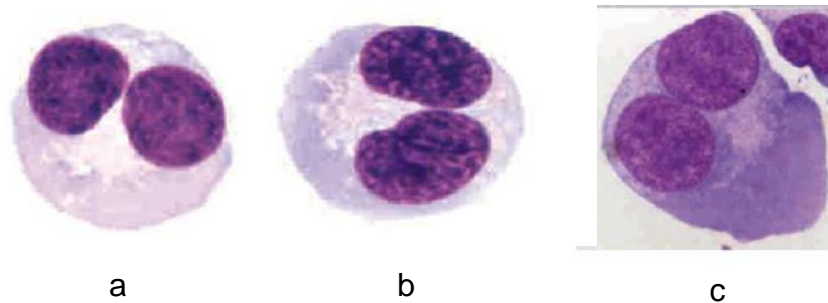


Figura 14: Fotomicrografias ilustrando diversos aspectos de células binucleadas (coradas com Giemsa) que se enquadram nos critérios de análise. Em (a) núcleos arredondados; (b) núcleos ovais; e (c) mostra o limite entre duas células adjacentes (RIBEIRO *et al.*, 2003).

3.5.4 Análise dos Micronúcleos (MN)

A análise foi realizada em 1000 células binucleadas para cada um dos diferentes grupos avaliados, com os micronúcleos 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 (FENECH, 2000) (Figura 15).

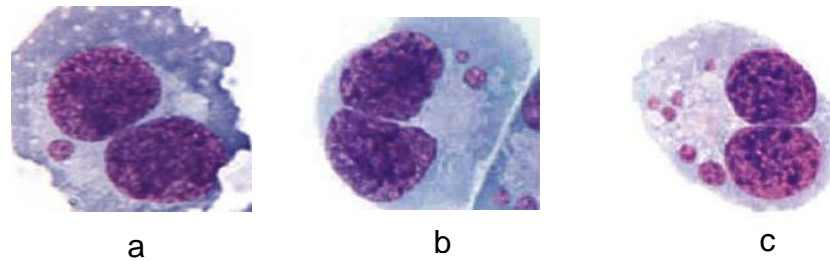


Figura 15: Fotomicrografias ilustrando células binucleadas micronucleadas (coradas com Giemsa) com um (a), dois (b) e seis (c) micronúcleos. Todas as células obedecem aos critérios de análise para micronúcleo (RIBEIRO *et al.*, 2003).

3.5.5 Análise das Pontes Nucleoplasmáticas (PNP) e dos Brotos Nucleares (BN)

As frequências de pontes nucleoplasmáticas e de brotos nucleares foram avaliadas em 1000 células binucleadas para cada parâmetro. As PNP correspondem a biomarcadores de instabilidade genômica que se expressam como ligações contínuas entre os núcleos das células binucleadas e que parecem ser resultantes de rearranjos cromossômicos envolvendo mais de um centrômero ou de cromátides que migram para pólos opostos da célula durante a anáfase; enquanto que, os brotos nucleares, são estruturas semelhantes aos micronúcleos, que, porém estão conectados ao núcleo, constituindo importantes indicadores de amplificação gênica (FENECH, 2000) (Figura 16).

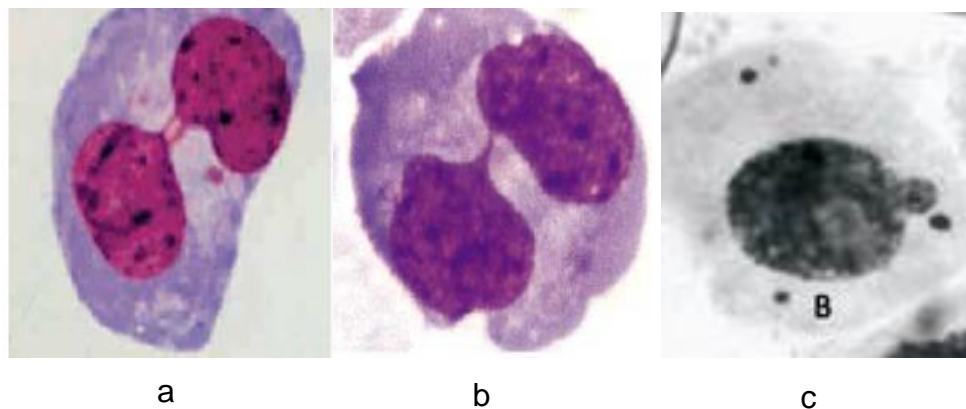


Figura 16: Fotomicrografias ilustrando duas células binucleadas e uma mononucleada (coradas com Giemsa) com PNP e BN. Em (a) observa-se uma célula binucleada com duas PNP e um MN, em (b) uma célula binucleada com uma PNP e em (c) uma célula mononucleada com um BN (RIBEIRO *et al.*, 2003).

3.5.6 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. Este parâmetro é um importante biomarcador utilizado na avaliação dos efeitos citostáticos dos agentes em estudo (FENECH, 2000) (Figura 17).

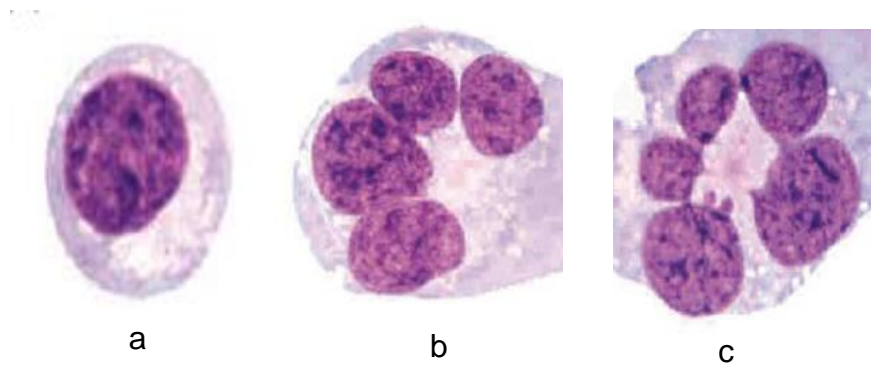


Figura 17: Fotomicrografias ilustrando células multinucleadas (coradas com Giemsa). Em a: uma célula mononucleada; b: uma tetranucleada; e em c: uma célula multinucleada com 5 núcleos (RIBEIRO *et al.*, 2003).

3.6 HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* PARA MICRONÚCLEO (FISHMN)

3.6.1 Princípio da Técnica

A Hibridação Fluorescente *In Situ* (FISH) é um método baseado na propriedade de complementariedade do DNA, característica que torna possível por hibridação com sondas específicas (seqüências específicas de DNA ou RNA) a detecção e a localização de seqüências de DNA de interesse. É uma técnica bastante valiosa na identificação e quantificação de alterações cromossômicas, sejam elas numéricas ou estruturais (CHUNG *et al.*, 2002; STAINO-FLORES *et al.*, 2009).

3.6.2 Procedimento Experimental e Análise das Lâminas

O FISHMN foi realizado utilizando-se um mix de sondas centroméricas de marcação direta, com representante de todos os cromossomos humanos (Cytocell aquarius).

3.6.2.1 Pré-tratamento das Lâminas

Após a obtenção das lâminas pelo procedimento do micronúcleo convencional, as lâminas separadas para o FISHMN foram primeiramente tratadas por 2 min com 2XSSC (Citrato de Sódio Salino) em temperatura ambiente (TA). Em seguida, na mesma temperatura, foram submetidas à desidratação em concentrações seriais crescentes de etanol 70, 85 e 100 %, por 2 min cada passagem e posteriormente levadas para secagem em TA.

3.6.2.2 Desnaturação e Hibridação

Após a secagem das lâminas, a sonda foi diluída a 30 % em Hibrizol em um ambiente com baixa luminosidade, homogeneizada em vórtex e posteriormente incubada em banho-maria à 37 °C por 5 min. Simultaneamente, as lâminas foram pré-aquecidas em estufa à 37 °C também por 5 min. Em sequência, foram aplicados 10 µL da sonda sobre cada lâmina e em seguida aplicadas as lamínulas. As bordas das lâminas foram vedadas com solução rubber e secas em TA. Após este procedimento, as amostras na lâmina e a sonda foram desnaturadas simultaneamente por aquecimento em placa quente à 75 °C por 2 min e em sequência transferidas para câmara úmida e protegida da luz, e mantidas em estufa à 37 °C por aproximadamente 16 h.

3.6.2.3 Lavagem Pós-hibridação e Contra-coloração

Passada a etapa de hibridação, as lâminas foram incubadas em solução de 0,25 X SSC à 72 °C por 2 min sem agitação e em seguida deixadas secar em TA. Após a secagem, foram incubadas em solução de Tween 20 0,05 %/2 X SSC por 30 segundos em TA e sem agitação e novamente deixadas secar em TA. Em sequência, foi realizada uma contra-coloração com a aplicação de DAPI *antifade* em cada lâmina. Para isso, foram administrados 20 µL de DAPI em cada lâmina, e em seguida as lamínulas foram aplicadas, removendo-se quaisquer bolhas que surgirem. Por fim, as lâminas foram transferidas para uma câmara úmida, protegida da luz e mantidas à 37 °C por 10 min.

3.6.2.4 Análise das Lâminas

A análise citogenética molecular foi realizada em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX41, com filtro triplo DAPI/FITC/TRITC. A captura e a análise das imagens foram realizadas pelo programa “Applied Spectral Imaging”. Um total de 1000 células binucleadas foi analisado e os micronúcleos presentes foram distinguidos de acordo com a presença ou ausência de marcação centromérica, sendo classificados como centrômeros-positivos (C+MN) ou centrômeros-negativos (C-MN) (Figura 18).

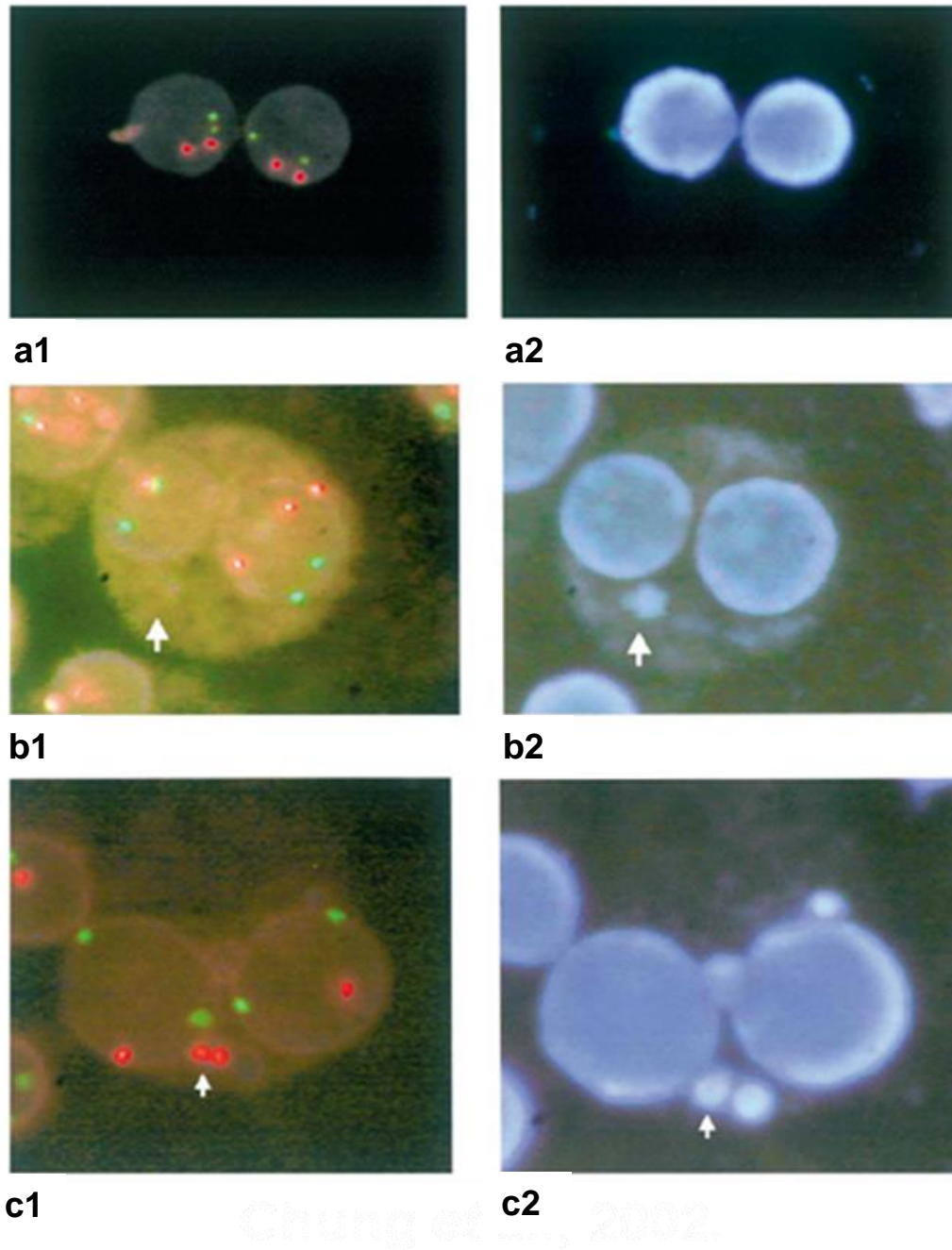


Figura 18: Fotomicrografia com diversos padrões de células binucleadas (BIN) analisadas pelo método de FISHMN e visualizadas em microscópio de fluorescência. a1: célula BIN marcada com sondas centroméricas específicas; a2: mesma célula de a1, porém marcada apenas com DAPI II; b1: célula BIN micronucleada (1 MN) centrômero-negativa (C-MN); b2: mesma célula de b1, porém marcada apenas com DAPI II; c1: célula BIN micronucleada (4 MN) centrômero-positiva (2 marcações vermelhas mostradas pela seta); e c2: mesma célula de c1, porém marcada apenas com DAPI II (adaptado de CHUNG *et al*, 2002).

3.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CASP8, CASP9 E CITOCROMO C POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

3.7.1 Princípio da Técnica

É um ensaio baseado na reação entre um antígeno, ou seja, uma proteína ou qualquer outra molécula de interesse; e um anticorpo, o qual se apresenta conjugado com uma molécula fluorescente denominada fluorocromo, composto este, que absorve luz em um determinado comprimento de onda e emite em outro maior (Figura 19). Um dos fluorocromos mais utilizados nesta técnica é o isotiocianato de fluoresceína (FITC), de cor verde, com absorção em 490 nm e emissão em 520 nm. A visualização e análise dos resultados obtidos por esta técnica, são realizadas por meio de microscópio de fluorescência ou confocal (AOKI *et al.*, 2010).

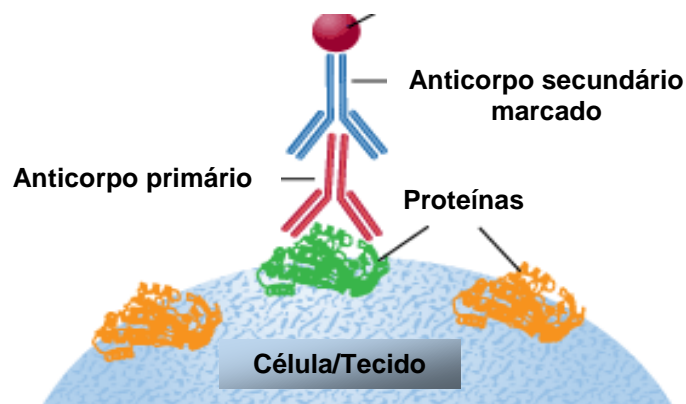


Figura 19: Desenho esquemático mostrando o princípio da técnica de imunofluorescência (<http://images.google.com.br>)

3.7.2 Procedimento Experimental e Análise das Lâminas

3.7.2.1 Fixação das Células

Após 20 h em cultivo, as células foram tratadas por 24 h com artesunato 2 µg/mL, que foi a concentração que demonstrou maior efeito nos ensaios citotóxicos e genotóxicos realizados anteriormente no laboratório de citogenética humana (MOTA *et al*, 2011). Vale ressaltar que além do tratamento com a droga em estudo, foram realizados um controle negativo em que as células foram expostas apenas ao meio de cultura (RPMI 1640 suplementado com 20 % FBS e 4 % de Fitohemaglutinina A) e um controle positivo com 0,02 µg/mL de doxorubicina, uma vez que estudos demonstram que esta droga é um agente genotóxico e citotóxico que induz morte celular pela via das caspases (LUANPITPON, *et al*. 2012). Passado o tempo de tratamento, as células foram centrifugadas à 1000 rpm por 5 min, em seguida lavadas três vezes com 1 mL de PBS 1X e então fixadas por 20 min em 1 mL de paraformaldeído 4 %. Após o período de fixação, as células foram centrifugadas novamente à 1000 rpm por 5 min, o sobrenadante descartado e as mesmas lavadas 2 vezes com 1 mL de PBS 1X. Posterior à última lavagem, as células foram centrifugadas na mesma rotação e tempo das anteriores, o sobrenadante descartado e então ressuspendidas em 1 mL de PBS 1X. Deste 1 mL, foram aplicados 200 µL de amostra em cada lâmina, as quais foram levadas para secagem em TA de um dia para o outro, uma vez que o nosso modelo experimental são células em suspensão. Vale ressaltar que as lâminas foram delimitadas com cola de isopor anterior à aplicação da amostra, afim de realizar os tratamentos e lavagens.

3.7.2.2 Permeabilização, Bloqueio e Incubação com o Anticorpo Primário

No dia seguinte, foram realizadas 3 lavagens com PBS 1X, sendo uma rápida e duas com agitação por 15 min. Após este processo, as células foram permeabilizadas com 150 µL de Triton X-100 0,5 % + DMSO 1 % + Normal Goat Serum 5 % em câmara úmida por 10 min em TA em leve agitação. Em seguida, a

solução de permeabilização foi removida, e as células bloqueadas com solução de BSA 5 % por 50 min em leve agitação. Após o bloqueio, as células foram incubadas com 150 µL de anticorpo primário 1:200 (CASP 8 – 8CSP03/sc-56070-mouse monoclonal IgG; CASP 9 – p10 F-7/sc-17784-mouse monoclonal IgG_{2a} e Citocromo C – 2G8/sc-65396-mouse monoclonal IgG) em câmara úmida, protegido da luz à 4 °C de um dia para o outro. Vale ressaltar, que o controle da técnica incubado com solução de permeabilização (Triton X-100 0,5 % + DMSO 1 % + Normal Goat Serum 5 %) também foi realizado.

3.7.2.3 Incubação com o Anticorpo Secundário, Contra-coloração e Montagem das Lâminas

No terceiro dia, o anticorpo primário foi removido e então realizadas três lavagens com BSA 5 %, sendo uma rápida e duas de 20 min em leve agitação. Em sequência foi realizada a incubação com 150 µL de anticorpo secundário 1:100 (Anti-Mouse IgG-Fab specific-FITC/SIGMA-Aldrich) em câmara úmida, protegido da luz por um período de 2 h à 4 °C. Passada a incubação com o anticorpo secundário, foram realizadas quatro lavagens com PBS 1X, sendo uma rápida e três de 20 min em leve agitação, ressaltando que essas lavagens foram realizadas protegidas da luz, uma vez que o anticorpo secundário é conjugado com o fluorocromo (FITC). Após as lavagens, foi realizada uma contra-coloração com 150 µL de DAPI (1:10.000) por 2 min em baixa luminosidade. Após esse processo, o DAPI foi removido e realizada uma lavagem com PBS 1X por 10 min em leve agitação e protegida da luz. Posteriormente, a cola de isopor utilizada para delimitar a lâmina foi removida e então, aplicada uma gota de solução de montagem (Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium-SIGMA F4680) na superfície da lâmina seguida da lamínula. Por fim, as lâminas foram deixadas secar protegidas da luz de um dia para o outro e então levadas para análise em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX41, com filtro triplo DAPI/FITC/TRITC. A captura e a análise das imagens foram realizadas pelo programa “Applied Spectral Imaging”. Análises qualitativas, com captura de imagens e análises quantitativas com a contagem de 300 células foram

analisadas, sendo que nesta última, as células foram distinguidas entre marcadas e não marcadas.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação das freqüências dos vários parâmetros, os resultados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo Teste Tukey do programa BIOESTAT 5.0 (AYRES *et al*, 2007). Em todas as análises o nível de significância utilizado foi de 5%.

4 RESULTADOS

Todos os resultados obtidos no presente estudo foram submetidos em revista internacional conceituada (Anexo 2).

4.1 EFEITO DO ARTESUNATO NO ESTRESSE OXIDATIVO DE LINFÓCITOS HUMANOS *IN VITRO*

O estresse oxidativo foi avaliado por dois ensaios específicos, um que quantifica os níveis de O_2^- no meio intracelular; e outro que avalia a quantidade de nitrito dentro e fora da célula. Desta forma, quando as células foram expostas ao ARS por um período de 1 h, observamos que houve um aumento nos níveis citosólicos de O_2^- em ambas as concentrações estudadas, sendo mais expressivo e estatisticamente significativo em relação ao controle, na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$), como pode ser constatado logo abaixo na figura 20.

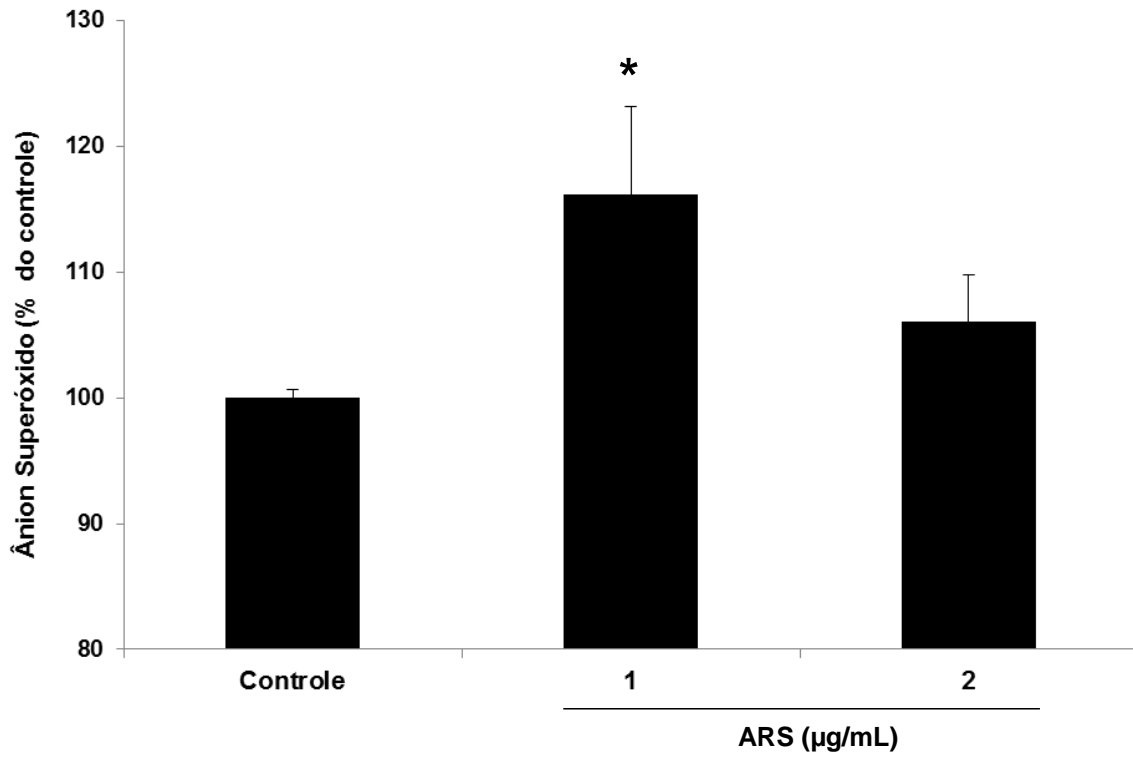


Figura 20: Efeito do artesunato (ARS) nos níveis de ânion superóxido em cultura de linfócitos humanos analisado pelo ensaio do NBT no período de 1 h. * $p < 0,05$ (ANOVA/pós-teste Tukey) em relação ao controle.

No que diz respeito à avaliação dos níveis de nitrito total, demonstrou-se que o artesunato também induziu um aumento estatisticamente significativo em relação ao controle ($p < 0,05$), na quantidade deste composto em nosso modelo de estudo nas duas concentrações testadas (Figura 21).

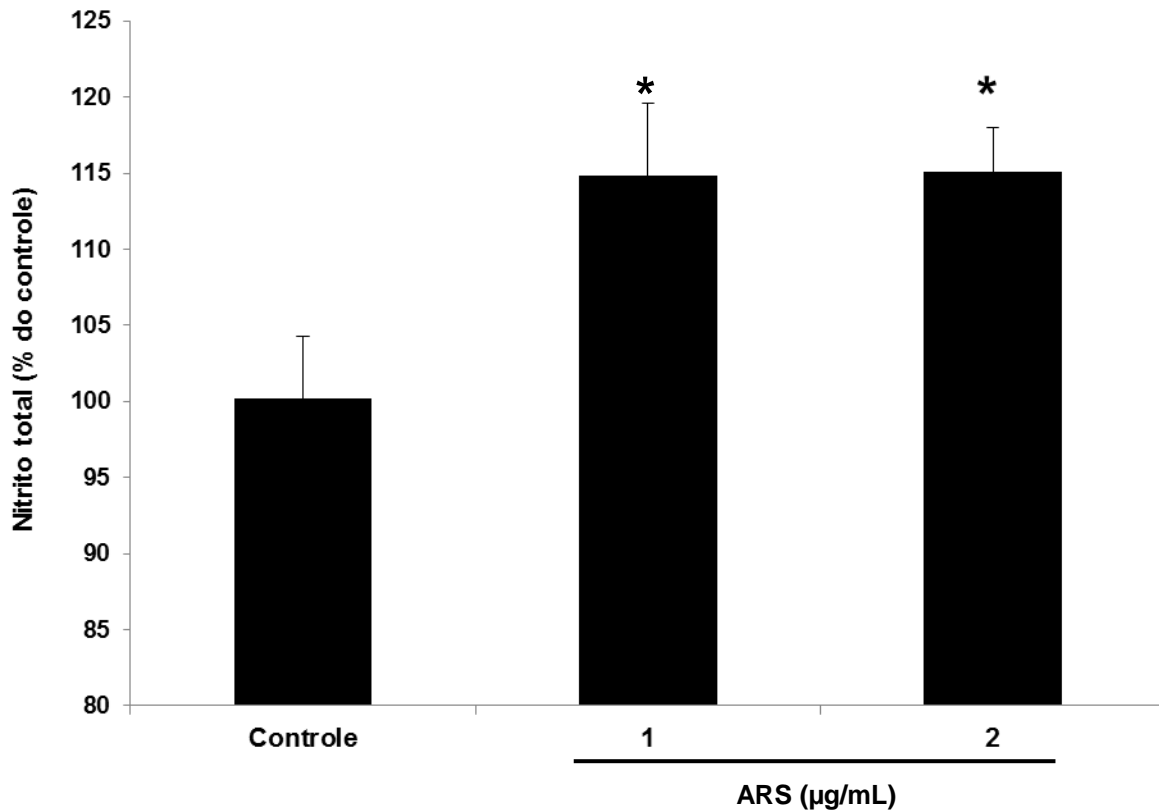


Figura 21: Efeito do artesunato (ARS) nos níveis totais de nitrito em cultura de linfócitos humanos analisado pelo teste do Nitrito no período de 1 h. * $p < 0,05$ (ANOVA/*pós*-teste Tukey) em relação ao controle.

4.2 EFEITO DO ARTESUNATO NA TAXA DE MICRONÚCLEOS EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS

Quanto ao teste do micronúcleo observou-se que o artesunato induziu um aumento significativo ($p < 0,01$) na frequência de MN apenas na concentração de 2 µg/mL. O controle negativo também diferiu significativamente ($p < 0,01$) do positivo (doxorubicina) (Figura 22).

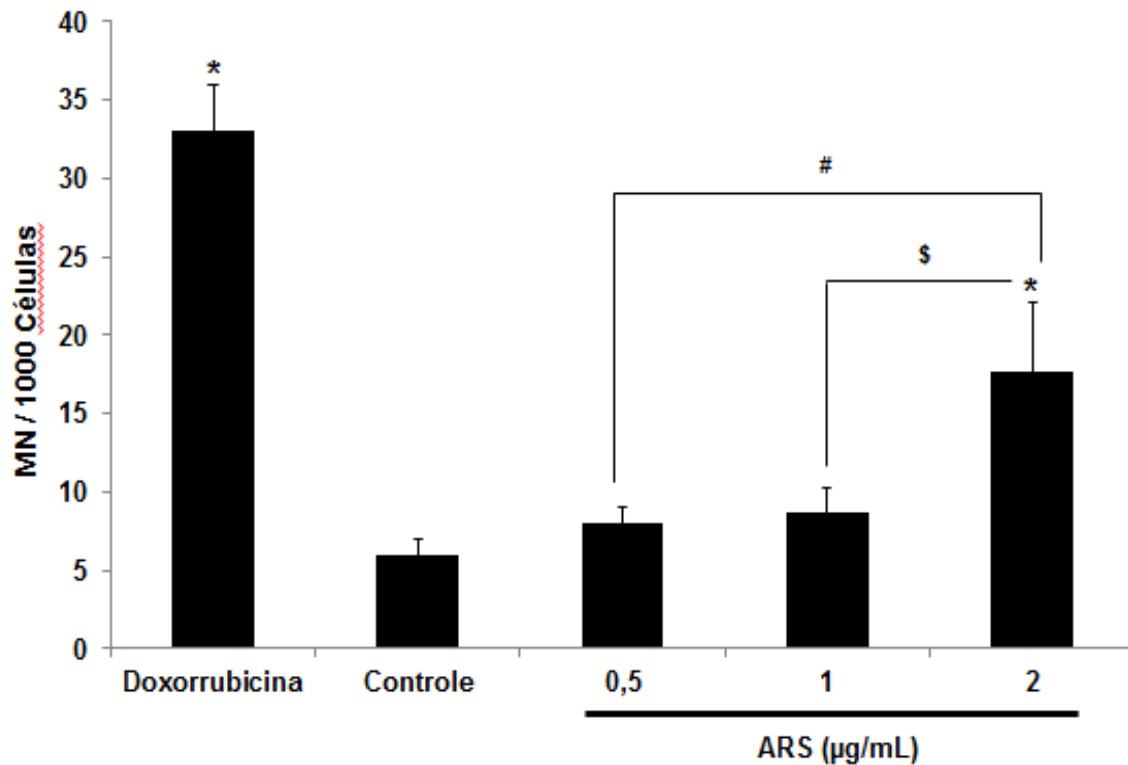


Figura 22: Efeito do artesunato (ARS) em cultura de linfócitos humanos analisados pelo teste do micronúcleo. * $p < 0,01$ em relação ao controle, # $p < 0,01$ (0,5 µg/mL vs. 2 µg/mL) e § $p < 0,05$ (1 µg/mL vs. 2 µg/mL) (ANOVA/pós-teste Tukey). Média de 3 (três) experimentos.

Com relação aos outros parâmetros analisados pelo teste do MN, foi demonstrado um aumento na indução de PNP das células em estudo, porém, com diferença estatística ($p < 0,05$) somente na concentração de 2 µg/mL em relação ao controle (Figura 23). Diferença estatística ($p < 0,01$) neste parâmetro também foi encontrada entre o controle negativo e o positivo (doxorubicina). No que diz respeito aos BN, observou-se um comportamento semelhante ao das PNP, porém, neste caso, o artesunato induziu um aumento estatisticamente significativo nas taxas de BN tanto na concentração de 1 µg/mL ($p < 0,05$), quanto de 2 µg/mL ($p < 0,01$). Não houve diferença estatística entre o controle negativo e o positivo (doxorubicina) (Figura 24).

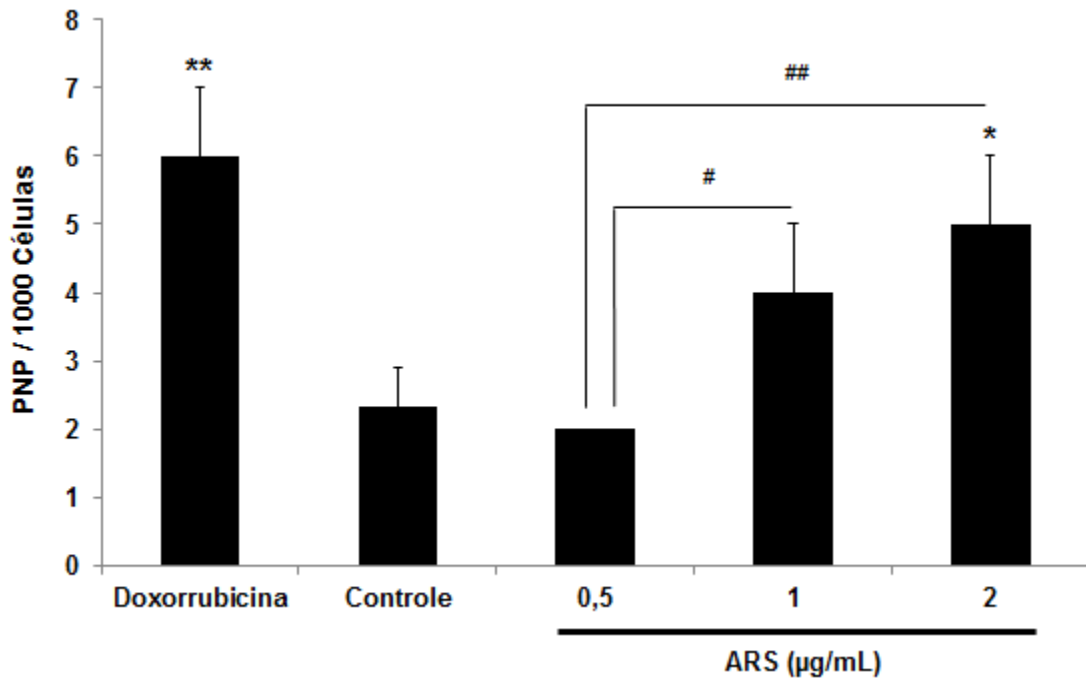


Figura 23: Efeito do artesunato (ARS) na indução de PNP em cultura de linfócitos humanos analisado pelo teste do micronúcleo. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ em relação ao controle, ## $p < 0,01$ (0,5 µg/mL vs. 2 µg/mL) e # $p < 0,05$ (0,5 µg/mL vs. 1 µg/mL) (ANOVA/pós-teste Tukey). Média de 3 (três) experimentos.

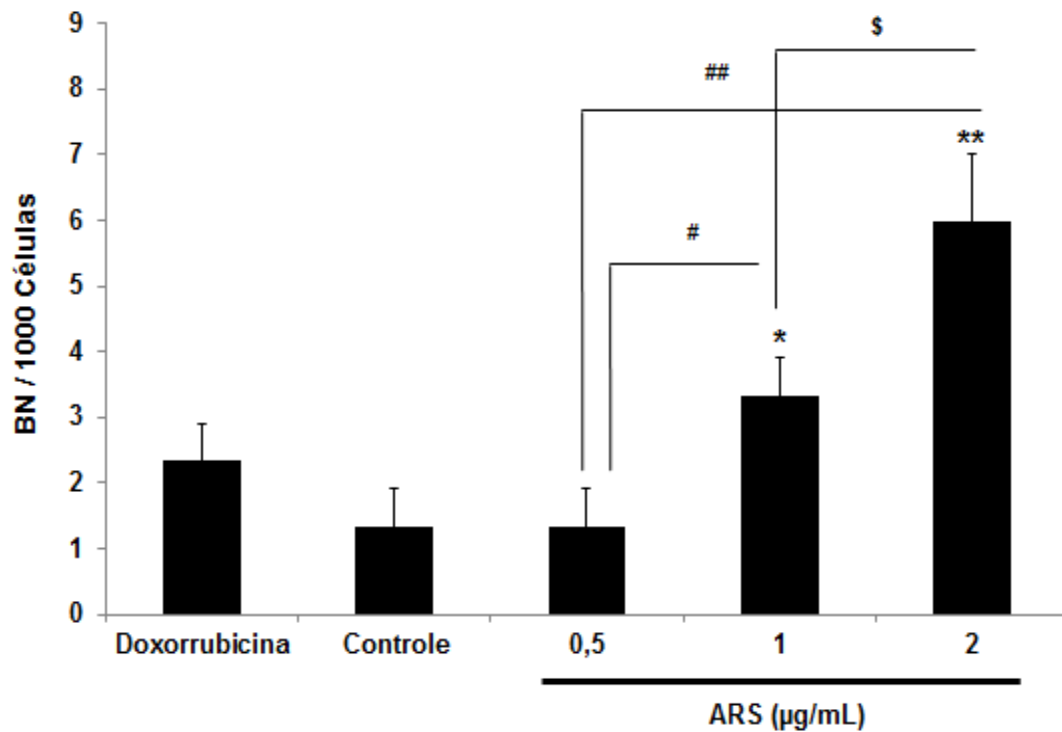


Figura 24: Efeito do artesunato (ARS) na indução de BN em cultura de linfócitos humanos analisado pelo teste do micronúcleo. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ em relação ao controle, ## $p < 0,01$ (0,5 µg/mL vs. 2 µg/mL); # $p < 0,05$ (0,5 µg/mL vs. 1 µg/mL) e § $p < 0,01$ (1 µg/mL vs. 2 µg/mL) (ANOVA/pós-teste Tukey). Média de 3 (três) experimentos.

Quanto ao IDN, verificou-se uma tendência na diminuição da taxa de divisão nuclear dos linfócitos nas concentrações de 1 e 2 $\mu\text{g/mL}$ de artesunato, no entanto, não houve diferença significativa em relação ao controle negativo (Tabela 1).

Tabela 1: Efeito do artesunato (ARS) no índice de divisão nuclear (IDN) de linfócitos humanos analisado pelo teste do micronúcleo.

Indivíduos	Índice de Divisão Nuclear (IDN)				
	Controle	Doxorrubicina (0,02 $\mu\text{g/mL}$)	ARS ($\mu\text{g/mL}$)		
			0,5	1	2
I1	1,53	1,47	1,53	1,47	1,38
I2	1,07	1,26	1,12	1,13	1,20
I3	1,38	1,50	1,57	1,17	1,27
Média	1,33	1,41	1,41	1,26	1,28
Desvpad	$\pm 0,23$	$\pm 0,13$	$\pm 0,25$	$\pm 0,19$	$\pm 0,09$

$p > 0,05$ (ANOVA).

Na figura 25, pode-se observar o aspecto das células binucleadas de linfócitos humanos obtidas no presente estudo, as quais foram analisadas dentro dos critérios de avaliação exigidos pelo teste do micronúcleo.

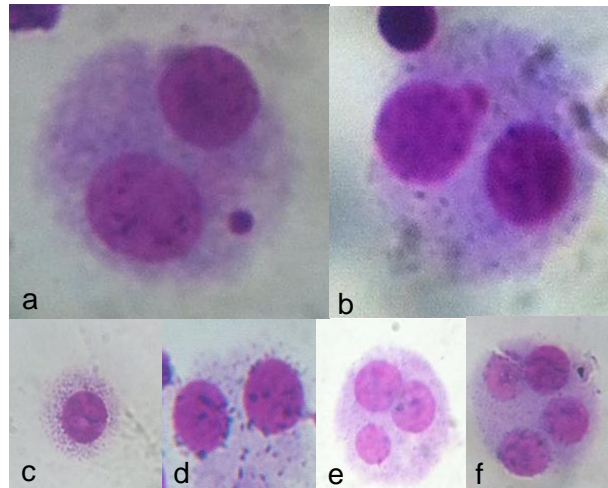


Figura 25: Fotomicrografias de células de linfócitos humanos obtidas no presente estudo após o tratamento com o artesunato e a realização do teste do micronúcleo convencional. a: uma célula binucleada com um MN; b: uma célula binucleada com um BN; e em c, d, e, f: células com um, dois, três e quatro núcleos respectivamente.

4.3 EFEITOS GENOTÓXICOS (CLASTOGÊNICIDADE E ANEUGÊNICIDADE) DO ARTESUNATO EM LINFÓCITOS HUMANOS AVALIADOS PELO TESTE DE FISHMN

Como pode ser observado na figura 26, após o tratamento dos linfócitos com o artesunato, observamos que houve um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$), tanto nas taxas de MN C-, quanto de MN C+ em todas as concentrações avaliadas em relação ao controle negativo, sendo dependente da concentração para a formação de MN C-. Demonstrou-se ainda, diferença estatística ($p < 0,01$), entre as taxas de MN C- e C+, evidenciando-se um comportamento clastogênico e aneugênico da droga, sendo o primeiro, predominante em relação ao segundo, uma vez que os níveis de MN C- foram maiores que os de MN C+.

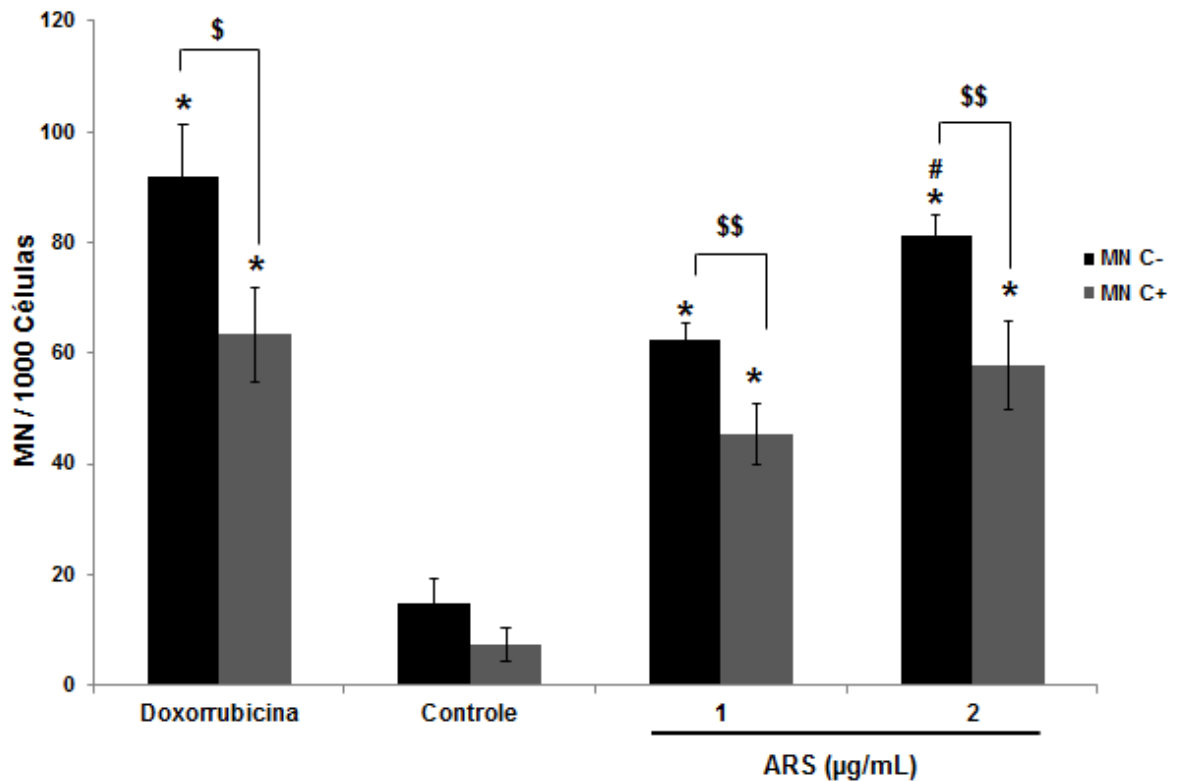


Figura 26: Efeito clastogênico e aneugênico do artesunato (ARS) em cultura de linfócitos humanos analisado pelo ensaio do FISHMN. * $p < 0,01$ em relação ao seu respectivo controle; \$\$ $p < 0,01$; \$ $p < 0,05$; # $p < 0,01$ (MN C-: 2 µg/mL vs. 1 µg/mL) (ANOVA/pós-teste Tukey). Média de 3 (três) experimentos.

Na figura 27, observam-se células binucleadas de linfócitos humanos obtidas no presente estudo pelo ensaio de FISHMN, as quais foram analisadas de acordo com os padrões exigidos por este teste.

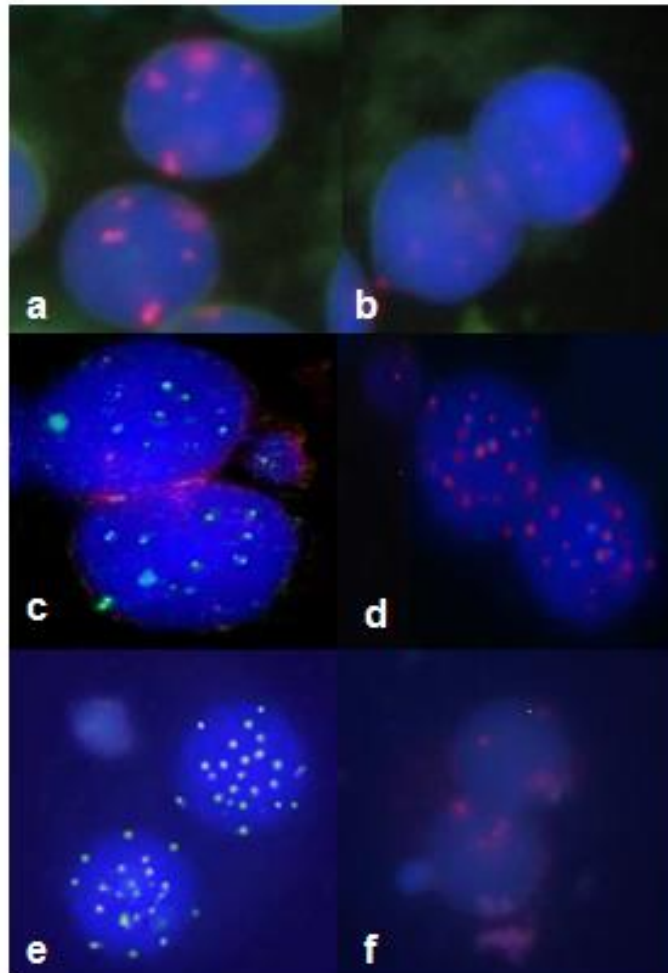


Figura 27: Fotomicrografia de células de linfócitos humanos obtidas no presente estudo após o tratamento com o artesunato, realização do teste de FISHMN e visualização em microscópio de fluorescência. a e b: células BIN sem MN; c e d: células BIN com C+MN; e e f: células BIN com C-MN.

4.4 EFEITO DO ARTESUNATO NA EXPRESSÃO DE CASP8, CASP9 E CITOCROMO C POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Após 24 h de tratamento com ARS, foi observado que os linfócitos apresentaram um aumento significativo na expressão de CASP 8 em relação ao controle negativo ($p < 0,01$). Efeito semelhante foi encontrado com o tratamento com doxorubicina, a qual foi utilizada como controle positivo (Figura 28).

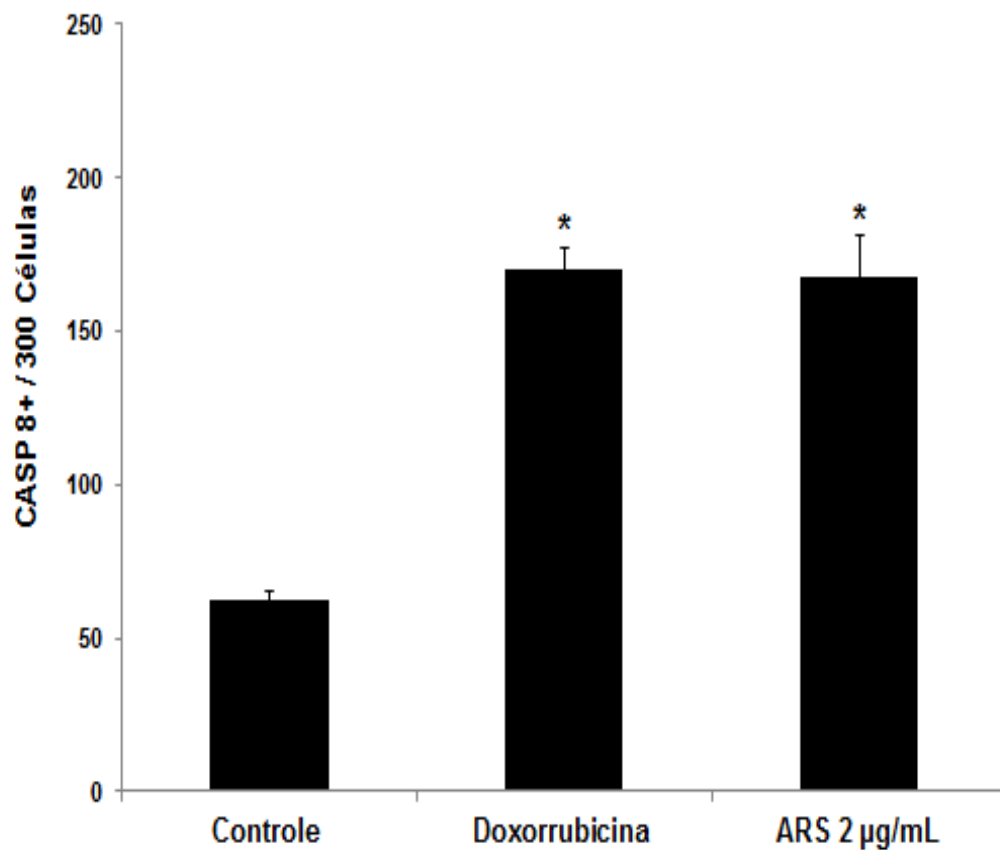


Figura 28: Efeito do artesunato (ARS) na expressão da CASP 8 em cultura de linfócitos humanos analisado por imunocitoquímica. * $p < 0,01$ (ANOVA/pós-teste Tukey) em relação ao controle. 300 células com marcação positiva foram analisadas em cada concentração. Média de 3 (três) experimentos.

Os dados quantitativos mostrados acima estão de acordo com os qualitativos (Figura 29), uma vez que o número de células marcadas após a exposição com o ARS e com a doxorrubicina, foi maior que o observado em células não expostas.

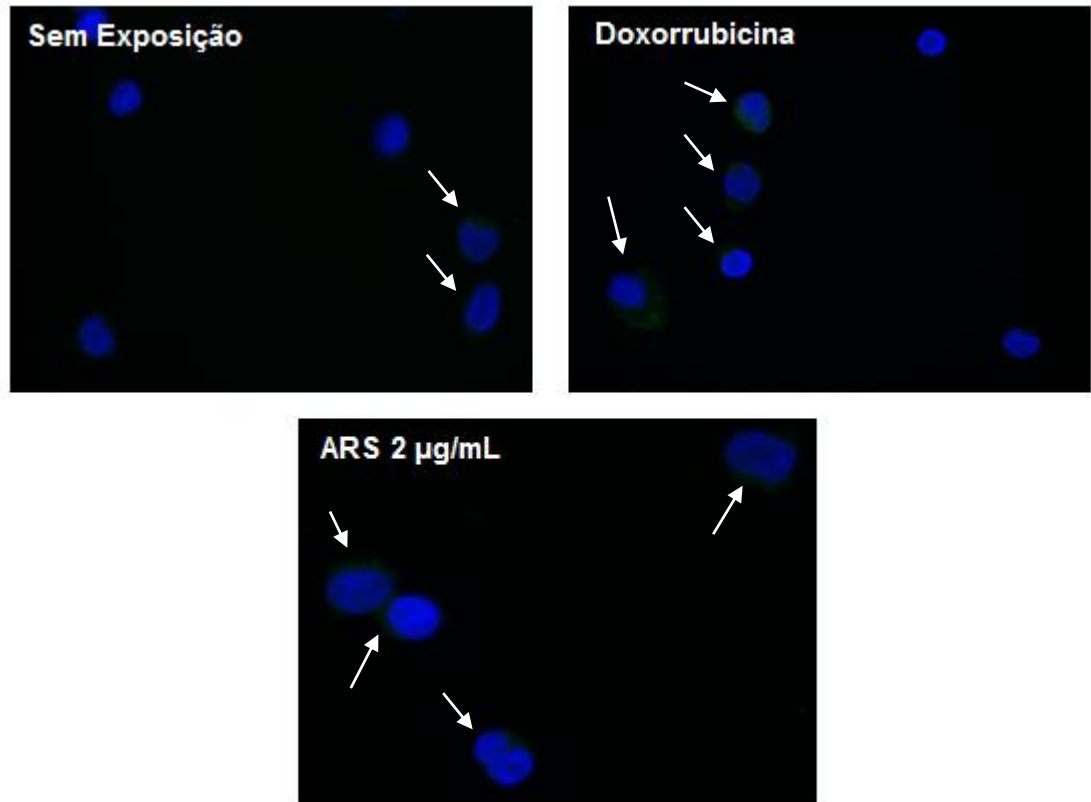


Figura 29: Fotomicrografias de células de linfócitos humanos obtidas no presente estudo por imunocitoquímica de fluorescência, mostrando o efeito do artesunato (ARS) na expressão da CASP 9 após 24 h de tratamento. As setas indicam marcação positiva em

Quando os linfócitos foram avaliados quanto à expressão de CASP 9 e Citocromo C, que são proteínas chave na ativação da via intrínseca da apoptose, pudemos observar que o ARS também apresentou um efeito estatisticamente significativo em relação ao controle negativo ($p < 0,01$) na expressão destas moléculas, sendo a expressão de Citocromo C até mesmo maior em relação à doxorrubicina ($p < 0,01$) (Figura 30 e 31). Semelhantemente ao observado no ensaio da CASP 8, a doxorrubicina também proporcionou aumento na expressão de CASP 9 e Citocromo C ($p < 0,01$).

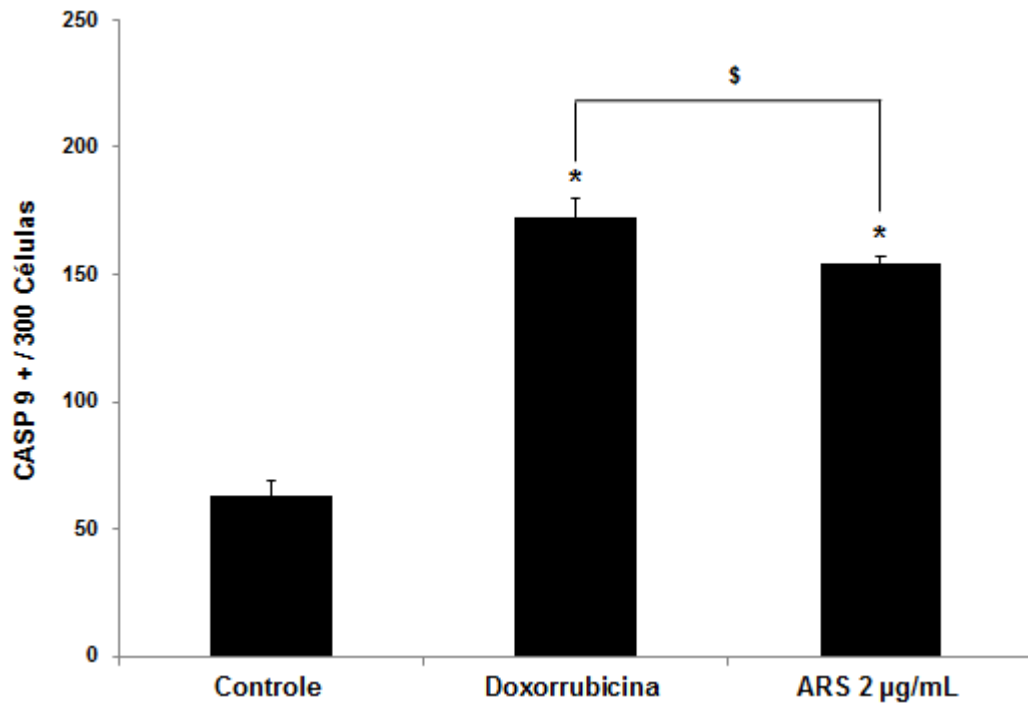


Figura 30: Efeito do artesunato (ARS) na expressão da CASP 9 em cultura de linfócitos humanos analisado por imunocitoquímica. * $p < 0,01$ em relação ao controle e $^{\$}p < 0,05$ (ANOVA/pós-teste Tukey). 300 células com marcação positiva foram analisadas em cada concentração. Média de 3 (três) experimentos.

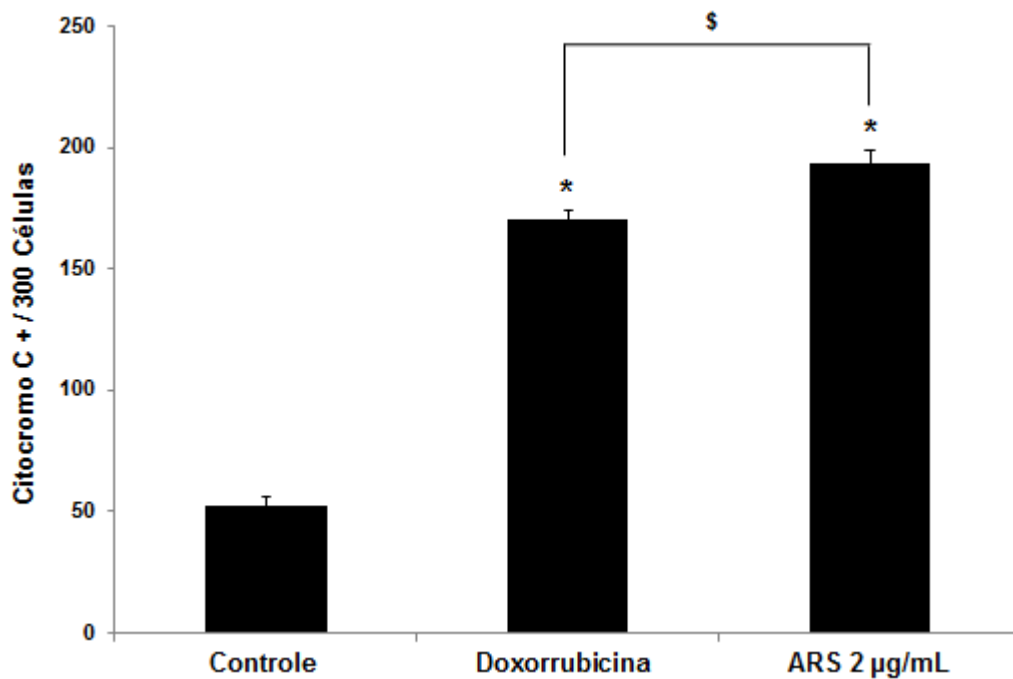


Figura 31: Efeito do artesunato (ARS) na expressão da Citocromo C em cultura de linfócitos humanos analisado por imunocitoquímica. * $p < 0,01$ em relação ao controle e $^{\$}p < 0,01$ (ANOVA/pós-teste Tukey). 300 células com marcação positiva foram analisadas em cada concentração. Média de 3 (três) experimentos.

Quando comparamos estes dados com os resultados qualitativos, é possível perceber que eles se correlacionam, uma vez que se pode observar um número maior de células marcadas para CASP 9 e Citocromo C nos grupos tratados (ARS e doxorubicina) em relação ao grupo não exposto à tratamento (Figuras 32 e 33).

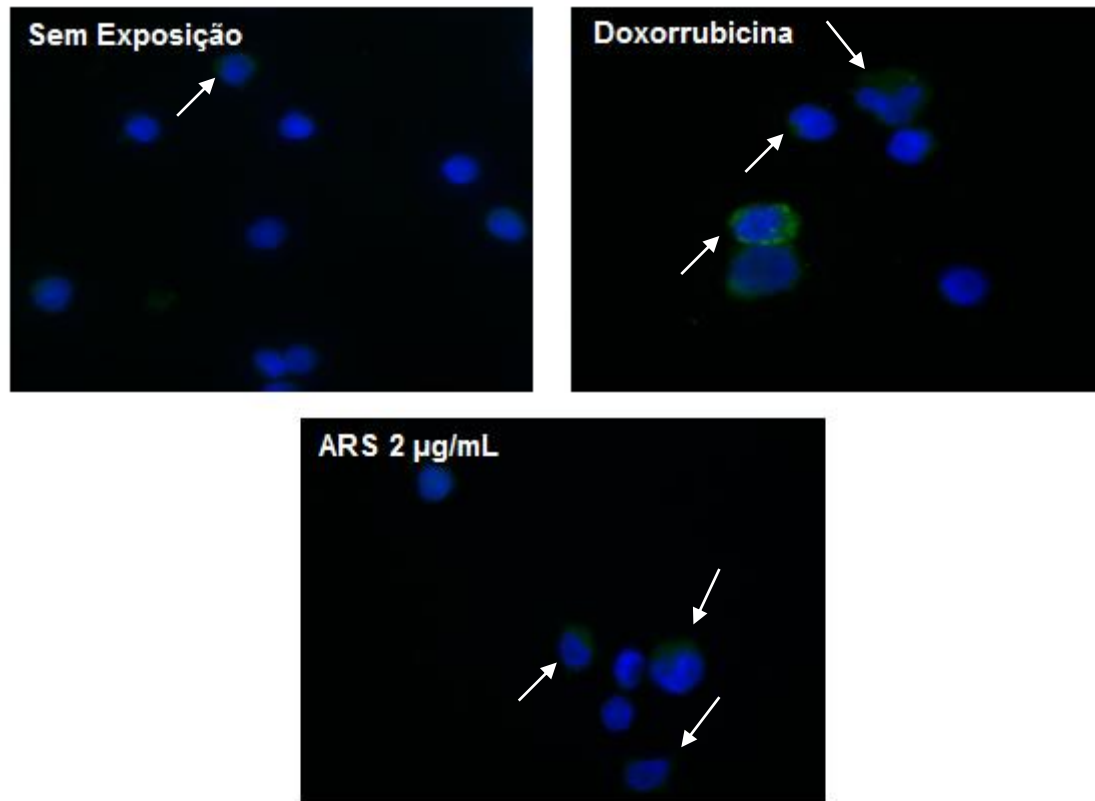


Figura 32: Fotomicrografias de células de linfócitos humanos obtidas no presente estudo por imunocitoquímica de fluorescência, mostrando o efeito do artesunato (ARS) na expressão da CASP 9 após 24 h de tratamento. As setas indicam marcação positiva em verde.

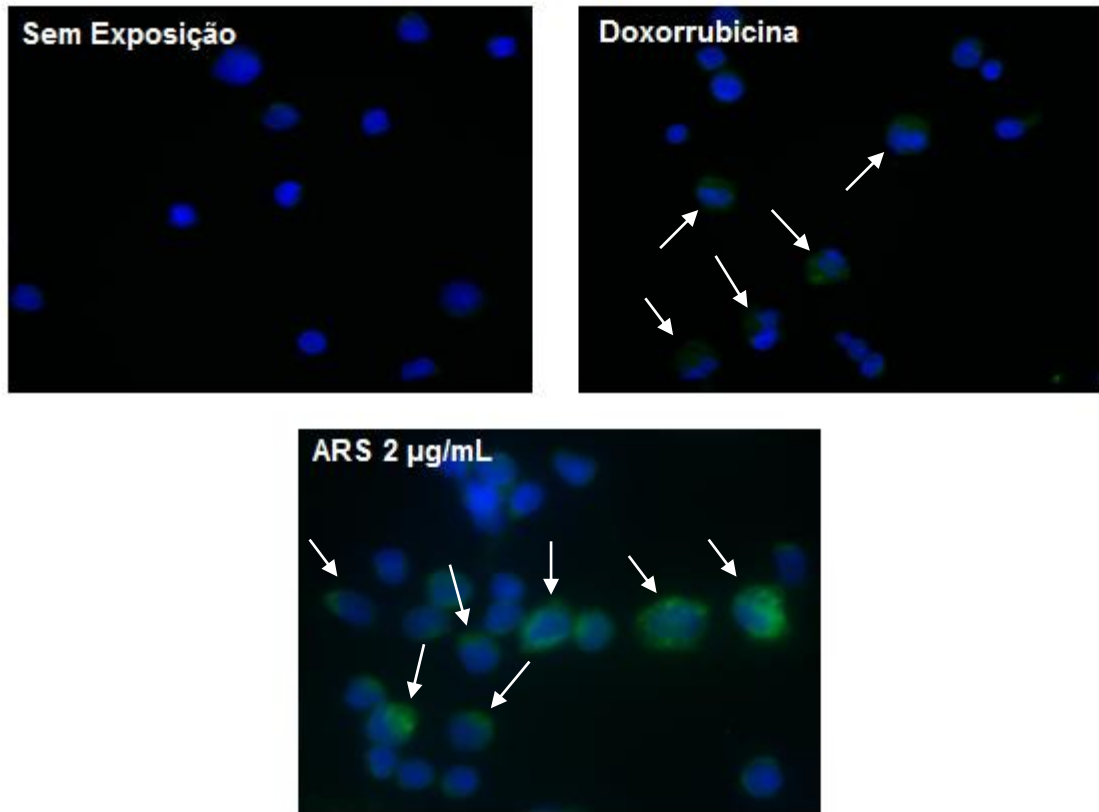


Figura 33: Fotomicrografias de células de linfócitos humanos obtidas no presente estudo por imunocitoquímica de fluorescência, mostrando o efeito do artesunato (ARS) na expressão do Citocromo C após 24 h de tratamento. As setas indicam marcação positiva em verde.

5 DISCUSSÃO

A malária é uma das doenças parasitárias mais sérias e difundidas no mundo havendo inúmeras drogas utilizadas em seu tratamento (WHO, 2008). A literatura especializada tem demonstrado muitos estudos a respeito da avaliação genotóxica e citotóxica de medicamentos antimaláricos em geral, apesar disto, e a despeito da artemisinina e seus derivados (artesanato e artemeter) serem utilizadas como drogas de primeira escolha no tratamento da malária, ainda hoje, não existem muitos trabalhos que demonstrem *in vitro* os mecanismos pelos quais estas drogas atuam nas células em geral (BOARETO *et al*, 2008; WHITE, 2008).

Em estudos prévios realizados no laboratório de citogenética humana, foi demonstrado que o artesunato (ARS) induz danos genotóxicos e citotóxicos no DNA de linfócitos humanos em cultura (MOTA *et al.*, 2011). Apesar destes achados, os mecanismos indutores de tais efeitos não foram devidamente caracterizados devido a limitações das técnicas utilizadas. Assim, o presente estudo pretendeu caracterizar *in vitro* os efeitos genotóxicos e citotóxicos do artesunato em cultura de linfócitos de sangue periférico humano utilizando-se técnicas como FISHMN, ensaios de estresse oxidativo e imunocitoquímica por imunofluorescência.

O estresse oxidativo é um importante fenômeno indutor de danos ao DNA. Assim, quando os linfócitos periféricos foram avaliados em relação a tal parâmetro, observamos que o ARS induziu um aumento significativo tanto nos níveis citosólicos de ânions radicais superóxidos (O_2^-) ($p < 0,05$), quanto na quantidade total de nitrito ($p < 0,05$) (Figuras 20 e 21), o que demonstra um claro efeito desta droga na indução de estresse oxidativo em nosso modelo experimental. De acordo com Moshage *et al.* (2009), o óxido nítrico pode reagir com O_2^- , formando peroxinitrito, um composto extremamente reativo e tóxico para as células, o qual é capaz de nitrosilar resíduos de tirosina, levando a formação de proteínas modificadas ou com suas funções inibidas, além de causar danos ao DNA.

Nossos resultados estão de acordo com Li *et al.* (2008), os quais demonstraram que de fato, o artesunato apresenta a capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio (radicais hidroxila e ânions radicais superóxidos) em determinadas células por meio da reação de Fenton Fe (II). E segundo os mesmos autores, tais radicais podem causar danos oxidativos no DNA e, estes, por sua vez, podem induzir quebras de fitas simples e duplas nesta molécula, o que conseqüentemente poderá levar à apoptose.

Outro achado interessante no que diz respeito à participação do artesunato no estresse oxidativo pode ser visto no trabalho de Gopalakrishnan & Kumar (2015) que demonstraram que esta droga (artesunato) induz a produção de ROS por meio da ativação da enzima NADPH oxidase, a qual está envolvida na produção de O_2^- . Os resultados destes autores corroboram com os encontrados no presente estudo, uma vez que o artesunato em nossas condições experimentais induziu claramente um aumento nos níveis de O_2^- nos linfócitos em cultura.

Cheng *et al.* (2013), também demonstraram em seus estudos o efeito do artesunato no estresse oxidativo. Tais autores observaram que esta droga induz a formação de espécies reativas de oxigênio e outros radicais livres em diferentes modelos experimentais, incluindo células endoteliais vasculares humanas. Eling *et al.* (2015) em seu trabalho com células cancerígenas de pâncreas também observaram a produção de radicais livres estimulada por artesunato.

Radicais livres, principalmente, o radical hidroxila ($\bullet OH$), o mais reativo e lesivo radical conhecido (o último a ser produzido na cascata de formação de ROS à partir de O_2^-), podem causar danos irreversíveis na molécula de DNA. O $\bullet OH$, apresenta grande afinidade pela base nitrogenada guanina, gerando 8-hidroxi ou 8-oxoguanina, metabólitos considerados mutagênicos. Como resultado destes eventos, o radical hidroxila, induz quebra na molécula de DNA, ligações cruzadas entre as fitas, e ainda, modificações de bases nitrogenadas, o que poderá levar à mutações e apoptose (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Em análises de *microarrays*, Youns *et al.* (2009) também observaram redução na expressão de SOD1 em células pancreáticas tratadas com artesunato e aumento na expressão desta enzima nas células tratadas com artemisinina. Segundo estes autores, é possível que a artemisinina tenha um maior potencial em gerar estresse oxidativo que o artesunato. Segundo Effert *et al.* (2003) e Effert & Volm (2005), células tumorais podem também apresentar resistência ao artesunato devido a expressão induzida de genes antioxidantes, porém esta hipótese deve ser futuramente melhor estudada.

Investigamos ainda os efeitos genotóxicos do artesunato quanto à clastogenicidade e aneugenicidade desta droga. Nossos resultados demonstraram pelo ensaio do MN convencional que o ARS induziu um aumento significativo ($p < 0,01$) na taxa de micronúcleos em linfócitos apenas na maior concentração (2 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 22). Para avaliar se estes MN são provenientes de quebras cromossômicas ou de cromossomos inteiros, foi realizado o ensaio de FISHMN. Desta forma, quando as células foram expostas ao ARS e avaliadas pelo ensaio de FISHMN, observou-se um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$), tanto nas taxas de C-MN, quanto de C+MN em todas as concentrações avaliadas, com predominância estatística para C-MN (Figura 26). Estes achados evidenciam que o efeito genotóxico do artesunato se caracteriza por um comportamento tanto clastogênico, quanto aneugênico em linfócitos humano *in vitro*, sendo o primeiro, predominante em relação ao segundo, uma vez que os níveis de C-MN foram maiores que os de C+MN.

Nossos achados estão de acordo com Aquino *et al.* (2011), os quais verificaram *in vivo*, que o artesunato em baixas concentrações (5 mg/Kg), induziu danos genotóxicos significativos em células de fígado de rato. Neste mesmo estudo, também *in vivo*, os autores observaram que em altas concentrações (50 e 100 mg/Kg), esta droga apresentou efeito clastogênico nas células da medula óssea do animal. Estes resultados, segundo os autores, sugerem bastante cautela quanto ao

uso prolongado ou de altas doses de artesunato por humanos submetidos a tratamento de qualquer tipo com esta droga.

Além do trabalho *in vivo*, Aquino *et al.* (2013) também estudaram os efeitos genotóxicos do artesunato em HepG2, uma linhagem de células de hepatoma humano. Neste estudo, os autores verificaram que o ARS induziu danos genotóxicos em concentrações bem similares (2,5, 5 e 10 µg/mL) às utilizadas no presente trabalho após 24 h de exposição.

De acordo com Li *et al.* (2008), o artesunato aumenta os níveis de γ -H2AX em células CHO-9, ainda que em concentrações maiores que as utilizadas em nosso estudo. Segundo estes mesmos autores, γ -H2AX é considerado um marcador para a formação de quebras de fita dupla de DNA, o que pode explicar o fato da taxa de C-MN ter sido maior que a de C+MN nos linfócitos expostos ao ARS no presente trabalho, uma vez que este tipo de MN é formado por quebras cromossômicas, no entanto, tal hipótese requer comprovação.

Kryscio *et al.* (2001), em estudo baseado na avaliação genotóxica de minérios de urânio em linfócitos de trabalhadores expostos a este agente por longo prazo, sugerem que as baixas percentagens de C+MN encontradas nestes indivíduos podem representar importantes biomarcadores de instabilidade genômica e predisposição ao câncer. Outro estudo de Senthilkumar *et al.* (2015), demonstraram que indivíduos expostos ao composto isocianato de metil apresentaram um aumento na taxa de micronúcleos. Segundo estes autores, tais achados sugerem que estes indivíduos apresentam grande susceptibilidade ao câncer.

Em nosso estudo observamos ainda um aumento no índice de pontes nucleoplasmáticas (PNP) e de brotos nucleares (BN) nas células tratadas com artesunato. Contudo, este aumento no que diz respeito às PNP só foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na concentração de 2 µg/mL quando

comparado ao controle (Figura 23). Quando avaliado o efeito do artesunato na indução de BN, verificamos que esta droga induziu um aumento estatisticamente significativo nas taxas de BN tanto na concentração de 1 µg/mL ($p < 0,05$) quanto de 2 µg/mL ($p < 0,01$) (Figura 24). As PNP correspondem a biomarcadores de instabilidade genômica que se expressam como ligações contínuas entre núcleos de células binucleadas e que parecem ser resultantes de rearranjos cromossômicos complexos envolvendo mais de um centrômero. Presume-se que elas ocorram quando os centrômeros de cromossomos dicêntricos são puxados para pólos opostos das células durante a anáfase. Já os BN, são estruturas semelhantes aos micronúcleos, que, porém, estão conectados ao núcleo, constituindo importantes indicadores de amplificação gênica (FENECH, 2006).

Nossos resultados indicam que o artesunato induz mudanças complexas nos cromossomos das células tratadas. Nossa hipótese é que as quebras de fita simples de DNA induzidas pelo artesunato (detectadas pelo ensaio do cometa em estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa) não estejam sendo reparadas e conseqüentemente estejam sendo convertidas em quebras de fita dupla. Estes danos podem evoluir para alterações cromossômicas estruturais (NATARAJAN, 2002) e por fim, levar à formação das pontes nucleoplasmáticas observadas. Esta hipótese é reforçada pelo que já foi exposto acima no trabalho de Li *et al.* (2008), os quais observaram que o ARS aumenta os níveis do biomarcador para quebras de fita dupla de DNA γ -H2AX em células CHO-9. Outro estudo que reforça o efeito do artesunato na formação de quebras de fita dupla de DNA é o de Berdelle *et al.* (2011), que demonstraram que esta droga induz danos oxidativos no DNA de linhagem de células de glioblastoma humano (LN-229), uma vez que o artesunato também aumenta os níveis de γ -H2AX nestas células.

No presente estudo, não encontramos redução significativa no índice de divisão nuclear (IDN) das células (Tabela 1). Em outras palavras, efeitos citostáticos induzidos pelo artesunato não foram detectados em nossas condições experimentais. No entanto, modificações na cinética do ciclo celular induzidas pelo

artesanato já foram observadas por outros autores. Veerasubramanian *et al.* (2006) demonstraram que o artesunato em concentrações similares às utilizadas em nosso estudo, apresenta a capacidade em reduzir a proliferação de linfócitos. 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 estudos, técnicas mais acuradas, tais como, citometria de fluxo e fluxometria foram utilizadas. Provavelmente, o IDN não seja um parâmetro sensível para a detecção de efeitos citostáticos nas condições avaliadas.

Mudanças na cinética do ciclo celular envolvendo a artemisinina, composto natural de onde é extraído o artesunato e dihidroartemisinina (DHA), metabólito ativo da artemisinina, também foram encontradas por Hou *et al.* (2008). Estes autores observaram que a artemisinina e a DHA após o ensaio de MTT, induziram uma redução significativa (de 84,7 para 15,5 % - $p < 0,01$) na viabilidade das células HepG2 em concentrações entre 1 e 100 μM após 48 h de tratamento. Ainda neste mesmo estudo foi observado que após o tratamento de HepG2 com artemisinina nas concentrações de 10, 25, e 50 μM , houve um aumento no número de células na fase G1 do ciclo celular em comparação às células não tratadas. Estes resultados mostram claramente que estas substâncias estão diminuindo a proliferação e induzindo parada do ciclo celular nestas células.

Mota *et al.* (2011) observaram em seus estudos que o artesunato é uma droga genotóxica e citotóxica com grande potencial mutagênico, que induz apoptose em linfócitos humanos *in vitro*; porém, não demonstraram qual via estaria induzindo este tipo de morte celular. Assim, observou-se no presente estudo que o tratamento das células com artesunato, aumentou de forma significativa ($p < 0,01$) a expressão de CASP 8 (Figuras 28 e 29), CASP 9 (Figuras 30 e 32), e citocromo C (Figuras 31 e 33); o que demonstra que o ARS induz apoptose nos linfócitos, tanto pela via extrínseca, constatada pelo aumento na expressão de CASP 8, quanto pela via intrínseca, devido ao aumento na expressão de CASP 9 e citocromo C.

A apoptose é um regulador chave para o controle do crescimento fisiológico e para a regulação homeostática de tecidos expostos a determinados agentes (AQUINO *et al.*, 2013). As artemisininas vêm ganhando destaque como potenciais drogas antineoplásicas. Por exemplo, um trabalho realizado por Li *et al.* (2009) mostrou que o artesunato exerce 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 fase G0/G1 e induzir apoptose nestas células, porém o mecanismo preciso deste efeito ainda é desconhecido.

Chen *et al.* (2009) demonstraram que a dihidroartemisinina, um dos principais metabólitos do artesunato, inibe a proliferação e induz apoptose em células de câncer pancreático de camundongos, tanto na condição *in vivo* quanto *in vitro*. Segundo Nam *et al.* (2007), a capacidade da artemisinina e seus derivados em induzir apoptose é uma das principais características que os destaca como potenciais agentes quimioterápicos.

De acordo com Mercer *et al.* (2007), a morte celular induzida por endoperóxidos, tais como o artesunato, é uma consequência da ativação de pontes endoperóxidas, condição esta que resulta na liberação de espécies reativas de oxigênio e outros radicais livres, substâncias responsáveis pela ativação da via apoptótica dependente de caspases. Neste contexto, Mota *et al.* (2011) sugerem que além de provavelmente serem responsáveis pelos efeitos genotóxicos, os radicais livres produzidos pelo ARS, também poderiam estar induzindo a morte celular observada nos linfócitos. E de fato, esta hipótese parece ser verdadeira, uma vez que o ARS induziu a produção de ânions radicais superóxidos e nitrito em linfócitos humanos no presente trabalho.

Foi observado no trabalho de Hou *et al.* (2008) que a artemisinina e a dihidroartemisinina induzem citotoxicidade em células HepG2 expostas por 48 h, inibindo a proliferação e ativando apoptose por meio de CASP 3, uma caspase

efetora que pode ser clivada tanto por CASP 8 quanto por CASP 9 levando à morte apoptótica.

Adicionalmente, Aquino *et al.* (2013), demonstraram efeitos genotóxicos da artemisinina e artesunato em células HepG2 nas concentrações de 7,5; 10 e 20 µg/mL após 24 h de exposição. Porém neste mesmo estudo quando avaliada a expressão de CASP 3, não foi observado aumento estatisticamente significativo na expressão deste gene, o que sugere segundo os autores, que estas drogas em HepG2, podem alterar de certa forma o ciclo celular, porém não induzem a apoptose. Este resultado discordante de Aquino *et al.* (2013) em relação ao de Hou *et al.* (2008), pode ser também devido ao menor tempo de exposição à droga no estudo do primeiro (24 h). Estes resultados estão de acordo com os mostrados no presente estudo, uma vez que o artesunato em nossas condições experimentais estimulou um aumento na expressão de CASP 8 e CASP 9 em linfócitos humanos em cultura, sendo que ambas moléculas ativam CASP 3.

Mercer *et al.* (2011) observaram em linhagens de células HeLa que o artesunato induz aumento na expressão de CASP 3 e CASP 7. Demonstraram ainda que esta droga estimula a liberação de citocromo C, o qual consequentemente ativa CASP 9, levando à ativação da via intrínseca da apoptose. Interessantemente também demonstraram que estes efeitos citotóxicos que levam a morte podem ser devido à interação do grupo endoperóxido, presente no artesunato, com o grupamento heme durante o metabolismo mitocondrial gerando ROS; e que estas ROS seriam as responsáveis pelos efeitos citotóxicos encontrados.

Nossos resultados estão de acordo com o trabalho citado acima, uma vez que o artesunato aumentou a expressão de CASP 9 e citocromo C em nosso modelo de estudo, sugerindo a participação da via intrínseca da apoptose. Em nosso trabalho também observamos a participação da via extrínseca por meio da ativação de CASP 8.

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que o artesunato induz efeitos genotóxicos com comportamento clastogênico e auneugênico em linfócitos humanos. Demonstraram ainda, que esta droga é citotóxica e induz apoptose tanto pela via extrínseca, quanto pela via intrínseca nas células em estudo. E por fim, que o artesunato induz estresse oxidativo em linfócitos humanos em nossas condições experimentais. Uma das grandes preocupações que surge a partir dos resultados encontrados no presente estudo, é a de que as modificações induzidas no DNA (efeito genotóxico) dos indivíduos que são submetidos a tratamento com o artesunato possam resultar em um aumento no risco de carcinogênese nestes pacientes. Além disto, a morte celular (efeito citotóxico) induzida por esta droga poderia desencadear doenças imunes ou promover infecção crônica; e tais disfunções imunes poderiam influenciar no desenvolvimento e progressão do câncer (SHENKER *et al*, 2000; ARARAGI, 2003).

A partir dos resultados encontrados no presente estudo é possível inferir que o artesunato induz a formação de ROS e outros radicais livres e que estas substâncias estão causando danos no DNA dos linfócitos humanos em cultura. Assim, as células com o DNA danificado, não sendo capazes de reverter tal condição, ativam a apoptose pelas vias extrínseca e intrínseca.

6 CONCLUSÃO

- ❖ O artesunato induz estresse oxidativo em linfócitos humanos por meio da formação de ânion radical superóxido e nitrito;
- ❖ O artesunato aumenta a frequência tanto de MN C-, quanto de MN C+ em linfócitos humano, o que caracteriza que esta droga apresenta tanto comportamento clastogênico, quanto aeneugênico;
- ❖ O artesunato induz um aumento na taxa de PNP e BN em linfócitos humanos;

- ❖ O artesunato não apresenta efeito no índice de divisão nuclear de linfócitos humanos;
- ❖ O artesunato induz morte apoptótica tanto pela via extrínseca (aumento na expressão de CASP8) quanto pela via intrínseca (aumento na expressão de CASP 9 e Citocromo C) em linfócitos humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-EISHA, A. & AFIFI, M. Genotoxic evaluation of the antimalarial drug, fansidar, in cultured human lymphocytes. **Cell Biology and Toxicology**, **20**: 303 – 311. 2004.
- ALBERT, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WATER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- AL-SABATI, K.; LLOYD, D.C.; EDWARDS, A. A. & STEGNAR, P. A Survey of Lymphocyte Chromosomal Damage in Slovenian Workers Exposed to Occupational Clastogens. **Mutat. Res.**, **280 (3)**: 215-223. 1992.
- 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.
- ALVAREZ, G.; PABÓN, A.; CARMONA, J. & BLAIR, S. Evaluation of Clastogenic Potential of the Antimalarial Plant *Solanum nudum*. **Phytother. Res.**, **18**: 845 - 848. 2004.
- AOKI, V.; SOUSA, J. X. Jr.; FUKUMORI, L. M. I.; PÉRIGO, A. M.; FREITAS, E. L.; OLIVEIRA, Z. N. P. Direct and indirect immunofluorescence. **An Bras Dermatol.**, **85 (4)**: 490 - 500. 2010.
- AQUINO, I.; PERAZZO, F. F.; MAISTRO, E. L. Genotoxicity assessment of the antimalarial compound artesunate in somatic cells of mice. **Food. Chem. Toxicol.**, **49(6)**: 1335 – 1339. 2011.
- AQUINO, I.; TSUBOY, M. S. F.; MARCARINI, J. C.; MANTOVANI, M. S.; PERAZZO, F. F. & MAISTRO, E. L. Genotoxic evaluation of the antimalarial drugs artemisinin and artesunate in human HepG2 cells and effects on CASP3 and SOD1 gene expressions. **Genetics and Molecular Research**, **12 (3)**: 2517 – 2527. 2013.
- ARARAGI, S.; KONDOH, M.; KAWASE, M.; SAITO, S.; HIGASHIMOTO, M. & SATO, M. Mercuric chloride induces apoptosis via a mitochondrial-dependent pathway in human leukemia cells. **Toxicology**, **184**: 1 - 9. 2003.
- ARREESRISOM, P.; DONDORP, A. M.; LOOAREESUWAN, S. & UDOMSANGPETCH, R. Suppressive effects of the anti-oxidant N-acetylcysteine on the anti-malarial activity of artesunate. **Parasitology International**, **56**: 221–226. 2007.
- ASAI, T.; LIU, Y.; BAE, N. & NIMER, S. D. The p53 Tumor Suppressor protein Regulates Hematopoietic Stem Cell Fate. **Journal of Cellular Physiology**, **226**: 2215 - 2221. 2011.

AYRES, M.; AYRES, M. J.; AYRES, D. M & DOS SANTOS, A. S. **Bioestat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém Pará, 2007.

BASU, U.; GOOD A. G. & TAYLOR G. J. Transgenic Brassica napus plants overexpressing aluminum-induced mitochondrial manganese superoxide dismutase cDNA are resistant to aluminum, **Plant Cell Environ.**, **24**: 1269 – 1278. 2001.

BERDELLE, N.; NIKOLOVA, T.; QUIROS, S.; EFFERTH, T. & KAINA, B. Artesunate Induces Oxidative DNA Damage, Sustained DNA Double-Strand Breaks, and the ATM/ATR Damage Response in Cancer Cells. **Mol Cancer Ther**; **10 (12)**: 2224 – 2233. 2011.

BERMAN, P. A. & ADAMS, P. A. Artemisinin enhances heme-catalysed oxidation of lipid membranes. **Free Radical Biology & Medicine.**, **22**: 1283 – 1288. 1997.

BILLEN, L. P.; SHAMAS-DIN, A. & ANDREWS, D. W. Bid: a Bax-like BH3 protein. **Oncogene**, **27(Suppl 1)**: S93 - 104. 2008.

BOARETO, A. C.; MULLER, J. C.; BUFALO, A. C.; BOTELHO, G. G. K.; ARAUJO, S. L.; FOGGIO, M. A.; MORAIS, R. N. & DALSENTER, P. R. Toxicity of Artemisinin [*Artemisia annua* L.] in Two Different Periods of Pregnancy in Wistar Rats. **Reproductive Toxicology**. **25**: 239–246. 2008.

BOGLIOLO, L. **Patologia Geral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

BREZNICEANU, M. L.; LIU, F.; WEI, C. C.; CHÉNIER, I.; GODIN, N.; ZHANG, S. L.; FILEP, J. G.; INGELFINGER, J. R. & CHAN, J.S. Attenuation of interstitial fibrosis and tubular apoptosis in db/db transgenic mice overexpressing catalase in renal proximal tubular cells. **Diabetes**, **57**: 451 - 459. 2008.

BROWN, C. J.; LAIN, S.; VERMA, C. S.; FERSHT, A. R. & LANE, D. P. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. **Nature reviews: Cancer**, **9(12)**: 862 - 73. 2009.

BRUCE-CHWATT, L. J. **Essential Malariology**. William Heinemann Medical Books Ltd, New York, 1985.

BURIM, R. V.; CANALLE, R.; LOPES, J. L. C.; VICHNEWSKI, W. & TAKAHASHI, C. S. Genotoxic Action of the Sesquiterpene Lactone Centratherin on Mammalian Cells In Vitro and In Vivo. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, **21**: 383 – 393. 2001.

CANALLE, R.; BURIM, R. V.; CALLEGARI LOPES, J. L. & TAKAHASHI, C. S. Assessment of the cytotoxic and clastogenic activities of the sesquiterpene lactone lynchnopholide in mammalian cells in vitro and in vivo. **Cancer Detect. Prev.**, **25(1)**: 93 - 101. 2001.

CHATGILIALOGLU, C.; O'NEILL, P. Free radicals associated with DNA damage. **Exp Gerontol**, **36**: 1459 - 1471. 2001.

CHATTERJEE, T.; MUHKOPADHYAY, A.; KHAN, K. A. & GIRI, A. K. Comparative mutagenic and genotoxic effects of three antimalarial drugs, chloroquine, primaquine and amodiaquine. **Mutagenesis**, **13 (6)**: 619-24. 1998.

CHEN, H.; SUN, B.; PAN, S. H.; LI, J.; XUE, D. B.; MENG, Q. H. & JIANG, H. C. Study on Anticancer Effect of Dihydroartemisinin on Pancreatic Cancer. **Zhonghua Wai Ke Za Zhi**, **47(13)**: 1002 - 1005. 2009.

CHENG, R.; LI, C.; LI, C.; WEI, L.; LI, L.; ZHANG, Y.; YAO, Y.; GU, X.; CAI, W.; YANG, Z.; MA, J.; YANG, X.; & GAO, G. The Artemisinin Derivative Artesunate Inhibits Corneal Neovascularization by Inducing ROS-Dependent Apoptosis in Vascular Endothelial Cells. **Biochemistry and Molecular Biology**, **54 (5)**: 3400 – 3409. 2013.

CHOI, H. S.; KIM, J. W.; CHA, Y-N. & KIM, C. A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining Intracellular Superoxide Anion Production in Phagocytic Cells. **Journal of Immunoassay & Immunochemistry**, **27**: 31 – 44. 2006.

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.

COIMBRA, M. A. E. L. S. Política pública e saúde: o caso da malária no Brasil. **DCP/UFGM**, **2 (1)**: 72 – 90. 1987.

COX, A.; DUNNING, A. M.; GARCIA-CLOSAS, M.; BALASUBRAMANIAN, S.; REED, M. W. & POOLEY, K. A. A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk. **Nat Genet.**, **39**: 352 - 8. 2007.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev.**, **82**: 47 - 95. 2002.

EFFERTH, T.; DUNSTAN, H.; SAUERBREY, A.; MIYACHI, H. & CHITAMBAR, C. R. The anti-malarial artesunate is also active against cancer. **Int J Oncol.**, **18**: 767 - 773. 2001.

EFFERTH, T.; SAUERBREY, A.; OLBRICH, A.; GEBHART, E.; RAUCH, P.; WEBER, H. O.; et al. Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines. **Mol Pharmacol.**, **64**: 382 - 394. 2003.

EFFERTH, T.; BENAKIS, A.; ROMERO, M. R.; TOMICIC, M.; RAUH, R.; STEINBACH, D.; et al. Enhancement of cytotoxicity of artemisinins toward cancer cells by ferrous iron. **Free Radic Biol Med.**, **37**: 998 - 1009. 2004.

EFFERTH, T & VOLM, M. Glutathione-related enzymes contribute to resistance of tumor cells and low toxicity in normal organs to artesunate. **In Vivo** **19**: 225 - 232. 2005.

EFFERTH, T.; GIAISI, M.; MERLING, A.; KRAMMER, P. H. & LI-WEBER, M. Artesunate Induces ROS-Mediated Apoptosis in Doxorubicin-Resistant T Leukemia Cells. **PLoS ONE**, **2 (8)**: 1 – 8. 2007.

EFEERTH, T.; ROMERO, M. R.; WOLF, D. G.; STAMMINGER, T.; MARIN, J. J. G. & MARSCHALL, M. The Antiviral Activities of Artemisinin and Artesunate. **Clinical Infectious Diseases**, **47**: 804 – 11. 2008.

EFFERTH, T.; RUCKER, G.; FALKENBERG, M.; MANN, D.; OLBRICH, A., *et al.* FABRY, U. & OSIEKA, R. Detection of apoptosis in KG-1a leukemic cells treated with investigational drugs. **Arzneimittelforschung**, **46**: 196 - 200. 1996.

ELING, N.; REUTER, L.; HAZIN, J.; HAMACHER-BRADY, A.; & BRADY, N. R. Identification of artesunate as a specific activator of ferroptosis in pancreatic cancer cells. **Oncoscience**, **2 (5)**: 517 – 532. 2015.

FAROMBI, E. O. Genotoxicity of chloroquine in rat liver cells: Protective role of free radical scavengers. **Cell Biol Toxicol**, **22**: 159–167. 2006.

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

FIRESTONE, G. L.; & SUNDAR, S. N. Anticancer activities of artemisinin and its bioactive derivatives. **Exp Rev Mol Med.**, **11**: (null-null). 2009.

GOPALAKRISHNAN, A. M.; KUMAR, N. Antimalarial Action of Artesunate Involves DNA Damage Mediated by Reactive Oxygen Species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **59 (1)**: 317 – 325. 2015.

GRIVICICH, I.; REGNER, A. & DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, **53(3)**: 335 - 343. 2007.

GUIMARÃES, A.P.A.; DIAS, F.L.; CARDOSO, R.S.; KRONKA, S.N. & SAKAMOTO-HOJO, E.T. 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.

HAJRA, K. M. & LIU, J. R. Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis**, **9**: 691 - 704. 2004.

HALDAR, K. & MOHANDAS, N. Malaria, Erythrocytic Infection, and Anemia. **Hemolytic Anemias**, **1**: 87 – 93. 2009.

HE, X-F.; YIN, S.; JI, Y-C.; SU, Z-S.; GENG, M-Y. & YUE, J-M. Sesquiterpenes and Dimeric Sesquiterpenoids from *Sarcandra glabra*. **J. Nat. Prod.** **73**: 45 - 50. 2010.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, **407**: 770 - 76. 2000.

HIEN, T. T.; PHU, N. H.; MAI, N. T.; CHAU, T. T.; TRANG, T. T.; LOC, P. P.; CUONG, B. M.; DUNG, N. T.; VIMH, H. & WALLER, D. J., *et al.* An open randomized comparison of intravenous and intramuscular artesunate in severe falciparum malaria. **Trans R. Soc. Trop. Méd. Hyg.**, **86**: 584 - 585. 1992.

HOU, J.; WANG, D.; ZHANG, R. & WANG, H. Experimental therapy of hepatoma with artemisinin and its derivatives: in vitro and in vivo activity, chemosensitization, and mechanisms of action. **Clin. Cancer Res.**, **14**: 5519 - 5530. 2008.

KEISER, J.; BRUN, R.; FRIED, B. & UTZINGER, J. Trematocidal Activity of Praziquantel and Artemisinin Derivatives: in vitro and in vivo investigations with adult *Echinostoma caproni*. **Antimicrob Agents Chemother**, **50**: 803 - 805. 2006a.

KEISER, J.; XIAO, S. H.; TANNER, M. & UTZINGER, J. Artesunate and Artemether are Effective Fasciolicides In the Rat Model and *In Vitro*. **J Antimicrob Chemother** **57**: 1139 - 1145. 2006b.

KELTER, G.; STEINBACH, D.; KONKIMALLA, V. B.; TAHARA, T.; TAKETANI, S.; FIEBIG, H-H. & EFFERTH, T. Role of Transferrin Receptor and the ABC Transporters ABCB6 and ABCB7 for Resistance and Differentiation of Tumor Cells towards Artesunate. **PLoS ONE**, **2 (8)**: 1 – 7. 2007.

KEHRER, J. P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, **149**: 43 - 50. 2000.

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

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A. & HOEKENGA, O. A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity, **Plant Soil** **274**: 175 – 195. 2005.

KONKIMALLA, V. B.; BLUNDER, M.; KORN, B.; SOOMRO, S. A.; JANSEN, H.; CHANG, W.; POSNER, G. H.; BAUER, R. & EFFERTH, T. Effect of Artemisinins and Other Endoperoxides on Nitric Oxide-Related Signaling Pathway In RAW 264.7 Mouse Macrophage Cells. **Nitric Oxide** **19**: 184 - 191. 2008.

KRYSCIO, A.; ULRICH MÜLLER, W. U.; WOJCIK, A.; KOTSCHY, N.; GROBELNY, S. & STREFFER, C. A cytogenetic analysis of the long-term effect of uranium mining on peripheral lymphocytes using the micronucleus-centromere assay. **Int J Radiat Biol.**, **77**: 1087 - 93. 2001.

KRISHNAJA, A. P. & CHAUHAN, P. S. Quinacrine dihydrochloride, the non-surgical female sterilant induces dicentric, rings, and marker chromosomes in human peripheral blood lymphocytes treated in vitro: a preliminary report. **Mutat. Res.**, **466**: 43 - 50. 2000.

KWON, Y. W.; MASUTANI, H.; NAKAMURA, H.; ISHII, Y. & YODOI, J. Redox regulation of cell growth and cell death. **Biol Chem.**, **384**: 991 - 996. 2003.

LEVINE, A. & OREN, M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. **Nature Reviews: Cancer**, **9 (10)**: 749 – 758. 2009.

LEVINE, N. D. Blood Parasites: the malaria and related parasites. In: The Protozoan Phylum Apicomplexa, **CRC Press Inc. Boca Raton Florida**. Vol 2, 11-21. 1988.

LI, P. C. H.; LAM, E.; ROOS, W.; ZDZIENICKA, M. Z.; KAINA, B. & EFFERTH. Artesunate Derived from Traditional Chinese Medicine Induces DNA Damage and Repair. **Cancer Res.**, **68 (11)**: 4347 – 4351. 2008.

LI, S.; XUE, F.; CHENG, Z.; YANG, X.; WANG, S.; GENG, F. & PAN, L. Effect of artesunate on inhibiting proliferation and inducing apoptosis of SP2/0 myeloma cells through affecting NF kappaB p65. **Int J Hematol**, **90 (4)**: 513 – 21. 2009.

LINDBERG, H. K.; FALCK, G. C.; JÄRVENTAU, H. & NORPPA, H. Characterization of chromosomes and chromosomal fragments in human lymphocyte micronuclei by telomeric and centromeric FISH. **Mutagenesis**, **23 (5)**: 371-6. 2008.

LINDEGARDH, N.; TARNING, J.; TOI, P. V.; HIEN, T. T.; FARRAR, J.; SINGHASIVANON, P.; WHITE, N. J.; ASHTON, M. & DAY, N. P. J. Quantitation of Artemisinin in Human Plasma Using Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, **49**: 768 -773. 2009.

LITTLE JOHN, B. Ionizing Radiation. In: **Cancer Medicine**. Bast Jr, R.C.; Kufe D.W.; Pollock, R. E.; Weichselbaum, R.R.; Holland, J.F. and Frei, E. 5th edition. Ed. B.C. Decker Inc. 2400 pp. 2000.

LIU, J. M.; NI, M. Y.; FAN, J. F.; TU, Y. Y.; WU, Z. H.; WU, Y. L. & CHOU, W. S. Structure and Reaction of Arteannuin. **Acta Chim. Sinica**, **37**: 129 - 143. 1979.

LUANPITPON, S.; CHANVORACHOTE, P.; NIMMANNIT, U.; LEONARD, S. S.; STEHLIK, C.; WANG, L.; ROJANASAKUL, Y. Mitochondrial superoxide mediates doxorubicin-induced keratinocyte apoptosis through oxidative modification of ERK and Bcl-2 ubiquitination. **Biochemical Pharmacology**, **83**: 1643 – 1654. 2012.

MERCER, A. E.; MAGGS, J. L.; SUN, X-M.; COHEN, G. M.; CHADWICK, J.; O'NEILL, P. M. & PARK, B. K. Evidence for the Involvement of Carbon-centered Radicals in the Induction of Apoptotic Cell Death by Artemisinin Compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, **282 (13)**: 9372 – 9382. 2007.

MERCER, A. E.; COPPLE, I. M.; MAGGS, J. L.; O'NEILL, P. M. & PARK, B. K. The Role of Heme and the Mitochondrion in the Chemical and Molecular Mechanisms of Mammalian Cell Death Induced by the Artemisinin Antimalarials. **The journal of biological chemistry**, **286 (2)**: 987 – 996. 2011.

MICHAELIS, M.; KLEINSCHMIDT, M. C.; BARTH, S.; ROTHWEILER, F.; GEILER, J.; BREITLING, R.; MAYER, B.; DEUBZER, H.; WITT, O.; KREUTER, J.; DOERR, H. W.; CINATL, J.; CINATL, J. Jr. Anti-cancer Effects of Artesunate in a Panel of Chemoresistant Neuroblastoma Cell Lines. **Biochemical Pharmacology**, doi:10.1016/j.bcp: 1 – 7. 2009.

MONTEIRO, M. R. C. C.; RIBEIRO, M. C. & FERNANDES, S. C. Aspectos clínicos e epidemiológicos da malária em um hospital universitário de Belém, Estado do Pará, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, **4 (2)**: 33 – 43. 2013.

MOSHAGE, H. Simple and Reliable Measurement of Nitric Oxide Metabolites in Plasma. **Clinical Chemistry**, **55 (10)**: 1881 - 1882. 2009.

MOTA, T. C.; CARDOSO, P. C. S.; GOMES, L. M.; VIEIRA, P. C. M.; CORRÊA, R. M. S.; SANTANA, P. D. P. B.; MIRANDA, M. S.; BURBANO, R. M. R. & BAHIA, M. O. *In vitro* evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of artesunate, an antimalarial drug, in human lymphocytes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, **52**: 590 - 594. 2011.

MOVAJAGH, A.; MALEKI, F.; MOHAMMADZADEH, S.G. & FADARI, S. Association of Glutathione S-transferase and Chromosomal Aberrations as a Means to Determine Occupational Exposure. **Int. Congress Series**, **1276**: 197-198. 2005.

MS. **Secretaria de Vigilância em Saúde 2015**. <http://dw.saude.gov.br>, acessado no dia 01 de julho de 2015.

NAM, W.; TAK, J.; RYU, J-K.; JUNG, M.; YOON, J-I.; KIM, H-J. & CHA, I-H. Effects of Artemisinin and its Derivatives on Growth Inhibition and Apoptosis of Oral Cancer cells. **Wiley Periodicals**, **29**: 335 – 340. 2007.

NATARAJAN, A. T. Techniques for Biomonitoring of Human Populations for Genetic Effects. **Rev. Brasil. Genet.** **16 (3)**: 841-847. 1993.

NATARAJAN, A. T. Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutat. Res.**, **504**: 3 - 16. 2002.

NICHOLSON, D. W. & THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends Biochem Sci.**, **22**: 299 - 306. 1997.

NOH, H. & HA, H. Reactive oxygen species and oxidative stress. **Contrib. Nephrol**, **170**: 102 - 12. 2011.

OLIVEIRA, A. B.; DOLABELA, M. F.; BRAGA, F. C.; JÁCOME, R. L. R. P.; VAROTTI, F. P. & PÓVOA, M. M. Plant-derived Antimalarial Agents: New Leads and Efficient Phythomedicines. Part I. Alkaloids. **An. Acad. Bras. Cienc.**, **81 (4)**: 715 – 740. 2009.

O'NEILL, P. M.; BARTON, V. E.; & WARD, S. A. The molecular mechanism of action of artemisinin—the debate continues. **Molecules**, **15**: 1705 – 1721. 2010.

OPS. Situación de los Programas de Malaria en las Americas. Informe XLV, PAHO/WHO, Washington. 1997.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION; **World Health Organization**. Status report on malaria programs in the Americas, **2002**. <http://www.paho.org/french/gov/csp/csp26-inf3-e.pdf>, acessado em 24 de Agosto de 2010.

POLAGER, S. & GINSBERG, D. P53 and E2F: partners in life and death. **Nature Reviews: Cancer**, **9 (10)**: 738 - 48. 2009.

PRICE, R. N. Artemisinin Drugs: Novel Antimalarial Agents. **Expert Opin Investig Drugs**, **9**: 1815 - 1827. 2000.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A.; LA, R. & MONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação. Ribeirão Preto. Sociedade Brasileira de Genética; **Revista Brasileira de Genética**, 246 pp. 1991.

RAMOS, A.; RIVERO, R.; VISOZO, A.; PILOTO, J. & GARCÍA, A. Parthenin, a Sesquiterpene Lactone of Parthenium Hysterophorus L. is a high toxicity clastogen. **Mutation Research**, **514 (1 - 2)**: 19 - 27. 2002.

SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, L. A.; UNSAL-KAÇMAZ, K. & LINN, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annu. Rev. Biochem.**, **73**: 39 - 85. 2004.

SASAKI, Y. F.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; OHTA, T.; ONO, T.; MATSUSAKA, N. & TSUDA, S. Simple Detection of *in vivo* Genotoxicity of Pyrimethamine in Rodents by the Modified Alkaline Single-Cell Gel Electrophoresis Assay. **Mutat. Res.**, **392 (3)**: 251 - 9. 1997.

SEN, C. K. Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. **Biochem. Pharmacol**, **55**: 1747 - 1758. 1998.

SENTHILKUMAR, C. S.; AKHTER, S.; MALLA, T. M.; SAH, N. K. & GANESH, N. Increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes contributes to cancer risk in the methyl isocyanate-affected population of Bhopal. **Asian Pac J Cancer Prev.**, **16 (10)**: 4409 - 4419. 2015.

SHENKER, B. J.; GUO, T. L. & SHAPIRO, I. M. Mercury-induced apoptosis in human lymphoid cells: evidence that the apoptotic pathway is mercurial species dependent. **Environ. Res.**, **84 (2)**: 89 - 99. 2000.

SOUNG, Y. H.; LEE, J. W.; KIM, S. Y.; JANG, J.; PARK, Y. G. & PARK, W. S. CASPASE-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinomas. **Cancer Res.**, **65**: 815 - 21. 2005.

STAINO-FLORES, C.; RAMQVIST-DARAI, E.; DOBRA, K. & HJERPE, A. Adaptation of a commercial fluorescent *in situ* hybridization test to the diagnosis of malignant cells in effusions. **Lung Cancer**, doi:10.1016/j.lungcan.2009.05.004. 2009.

THEODOROPOULOS, G. E.; MICHALOPOULOS, N. V.; PANOUSSOPOULOS, S. G.; TAKA, S. & GAZOULI, M. Effects of caspase-9 and survivin gene polymorphisms in pancreatic cancer risk and tumor characteristics. **Pancreas**, **39**: 976 - 80. 2010.

TRAORE, F.; GASQUET, M. & DI GIORGIO, C *et al.* Antimalarial Activity of Four Plants Used in Traditional Medicine in Mali. **Phytother. Res.**, **14**: 45 - 47. 2000.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S. & KUBOTA, L. T. Espécies reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, **30 (5)**: 1323 – 1338. 2007.

VASCONCELLOS, M. C.; ROSA, R. M.; MACHADO, M. S.; VILLELA, I. V.; CROTTI, A, E.; LOPES, J. L.; PESSOA, C.; de MORAES, M. O.; LOPES, N. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.,; SAFFI, J. & HENRIQUES, J. A. 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 J Trop Med Public Health**, **37 (5)**: 838 - 847. 2006.

VIJAYALAXMI, K. K. & VISHALAKSHI, M. Evaluation of the Genotoxic Effects of Pyrimethamine, an Antimalarial Drug, in the In Vivo Mouse. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, **20**: 65 – 71. 2000.

XIAO, S. H.; JIAN, X.; TANNER, M.; YONG-NIAN, Z.; KEISER, J.; UTZINGER, J. & HUI-QIANG, Q. Artemether, Artesunate, Praziquantel and Tribendimidine Administered Singly at Different Dosages Against *Clonorchis sinensis*: a comparative *in vivo* study. **Acta Trop.**, **106**: 54 - 59. 2008.

WHITE, N. J. Qinghaosu (Artemisinin): The Price of Success. **Science**, **320**: 330-334. 2008.

WHO. **The Africa Malaria Report. 2003.** <http://www.rollbackmalaria.org/amd2003/amr2003/pdf/amr2003.pdf>, acessado no dia 15 de junho de 2009.

WHO. **World Malaria Report. 2008.** <http://www.who.int/malaria/wmr2008/malaria2008.pdf>, acessado no dia 15 de abril de 2009.

WHO. Library Cataloguing-in-Publication Data; World malaria report : I. **World Health Organization**. ISBN 978 92 4 156469 4. 2013.

WNUK, M.; LEWINSKA, A.; OKLEJEWICZ, B.; BUGNO, M.; SLOTA, E. & BARTOSZ, G. Evaluation of the Cyto- and Genotoxic Activity of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in Human Lymphocytes *In Vitro*. **Mutation Research**, **679**: 18 - 23. 2009.

YOUNS, M.; EFFERTH, T.; REICHLING, J.; FELLEBERG, K. et al. Gene expression profiling identifies novel key players involved in the cytotoxic effect of Artesunate on pancreatic cancer cells. **Biochem. Pharmacol.**, **78**: 273 - 283. 2009.

ZILFOU, J. T. & LOWE, S. W. Tumor Suppressive Functions of p53. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, **1 (5)**, a001883. 2009.

ZHOU, Z. & FENG, Y. Artesunate reduces proliferation, interferes DNA replication and cell cycle and enhances apoptosis in vascular smooth muscle cells. **J Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.**, **25 (2)**: 135 - 136. 2005.

ANEXO 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS DA DROGA ANTIMALÁRICA ARTESUNATO EM LINFÓCITOS HUMANOS

As seguintes informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo.

O Laboratório de Citogenética Humana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará está desenvolvendo uma pesquisa que visa detectar os efeitos *in vitro* das drogas antimaláricas artesunato no DNA de indivíduos saudáveis. O artesunato já é usado rotineiramente no tratamento da malária, ainda assim, é importante aumentar os conhecimentos a respeito da ação desta droga no material genético de humanos, pois só assim se poderá minimizar ou eliminar a possibilidade do desenvolvimento de efeitos secundários indesejáveis sobre a saúde dos indivíduos.

Será obtida uma amostra de seu sangue (10 ml) através de punção venosa. A obtenção de seu sangue para a pesquisa pode implicar em riscos, tais como: dor e/ou hematoma local. No entanto, tais riscos são mínimos, uma vez que a coleta será realizada por profissional qualificado. O sangue coletado primeiramente será tratado *in vitro* com a droga artesunato, em seguida, ele será utilizado para análise de dano ao DNA, testes de estresse oxidativo e imunofluorescência. Não há benefício direto para o participante. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que o artesunato tem a capacidade de danificar o DNA em tubos de ensaio. Somente ao final do estudo, poderemos identificar a presença de algum benefício.

Em qualquer etapa do estudo, você ou seu responsável terão acesso aos profissionais relacionados com a pesquisa para esclarecimento de dúvidas. Os principais pesquisadores são os Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia e Prof. Dr. Rommel Burbano que podem ser encontrados no Laboratório de Citogenética Humana do

Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, Av. Augusto Correa, 01, Belém – PA, telefones (091)3201-7102.

O Comitê de Ética ao qual o projeto está sendo submetido para análise e apreciação tem como endereço: Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal Pará (CEP-ICS/UFPA), Complexo de Sala de Aula/ICS, Sala 14, Campus Universitário, nº 01, Guamá, CEP: 66075-110, Belém, Pará. Tel.: 3201-7735, E-mail: cepccs@ufpa.br; para maiores esclarecimentos.

 Acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “CARACTERIZAÇÃO IN VITRO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS DA DROGA ANTIMALÁRICA ARTESUNATO EM LINFÓCITOS HUMANOS”.

Eu discuti com o Dr. Marcelo de Oliveira Bahia sobre minha decisão de participar do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o processo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

_____/_____/_____
 Assinatura do voluntário

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e esclarecido deste voluntário ou representante legal para a participação neste estudo.

_____/_____/_____
 Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia

Fone: (91) 3226-8298/98869-8332

ANEXO 2

Submissão da Tese na Revista *Environmental and Molecular Mutagenesis*

Environmental and Molecular Mutagenesis



Environmental and
Molecular Mutagenesis

The antimalarial drug artesunate induces genotoxic and cytotoxic effects by oxidative stress and activation of caspases 8, 9 and cytochrome C in culture of human lymphocytes

Journal:	<i>Environmental and Molecular Mutagenesis</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Mota, Tatiane; Federal University of Pará, Garcia, Tarciane; Federal University of Pará, Bonfim, Lais; Federal University of Pará, Portilho, Adrhyann; Federal University of Pará, Pinto, Camila; Federal University of Pará, Burbano, Rommel; Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas Bahia, Marcelo; Federal University of Pará, Institute of Biological Sciences
Key Words:	artesunate , lymphocytes, genotoxicity, cytotoxicity, oxidative stress

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The antimalarial drug artesunate induces genotoxic and cytotoxic effects by oxidative stress and activation of caspases 8, 9 and cytochrome C in culture of human lymphocytes

Tatiane C. Mota, Tarcyane B. Garcia, Laís T. Bonfim, Adryann J. S. Portilho, Camila A. Pinto, Rommel M. R. Burbano and Marcelo O. Bahia*.

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

*Corresponding author: Universidade Federal do Pará, Campus Universitário do Guamá, Rua Augusto Corrêa 01, CEP: 66075-110, Belém, Pará, Brazil.

E-mail: mbahia@ufpa.br

Phone: +55(91)32017102

Fax: +55(91)32017568

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Artesunate is a semi-synthetic compound derived from artemisinin, a substance extracted from the Chinese plant *Artemisia annua* L. In previous studies made by our research group, it was shown that artesunate induces genotoxic and cytotoxic effects in human lymphocytes in vitro. Despite these findings, the mechanisms of these effects have not been adequately characterized due to limitations of the techniques used. The present study aims to assess in vitro the cytotoxic and genotoxic effects of artesunate on human lymphocytes using assays such as FISHMN, oxidative stress and immunocytochemistry. The results obtained in this study showed that artesunate induces clastogenic and aneugenic genotoxic effects in human lymphocytes. We also demonstrated that artesunate induces apoptosis by both extrinsic and intrinsic pathways and induces oxidative stress in human lymphocytes in our experimental conditions.

Keywords: artesunate, lymphocytes, genotoxicity, cytotoxicity, oxidative stress

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 Introduction

Artesunate is a semi-synthetic derivative of artemisinin that has been accepted as a treatment for malaria [Price, 2000]. Artesunate is recommended by the World Health Organization because several clinical studies involving malaria patients have shown that treatment with this drug is well-tolerated and has few side effects [Hien et al., 1992]. According to Arreesrisom et al. [2007], artesunate acts by inducing free radicals in the presence of the Fe⁺² that is released by malarial parasites during the process of heme degradation. However, Li et al. [2008] observed that in high concentrations, this drug can cause oxidative damage to the DNA of ovarian cells of hamsters; and this damage can cause single and double strand breaks, apoptosis and neurotoxicity.

The literature has reported several studies about the genotoxic and cytotoxic evaluation of antimalarial drugs. For example, Vasconcellos et al. [2007] found that the compound, 15- deoxygoyazensolide, induces mutations in *S. cerevisiae*. Ramos et al. [2002] showed that parthenin, another antimalarial lactone, induces the formation of chromosomal aberrations and micronuclei in peripheral lymphocytes. However, even though artemisinin and its derivatives have been used as first line drugs to treat malaria, even today, there are few studies that show in vitro the mechanisms by which these drugs act in cells [Boareto et al., 2008; White, 2008].

Mota et al. [2011] reported that artesunate induces genotoxic and cytotoxic effects in human lymphocytes in vitro. Despite these findings, the mechanisms of these effects have not been adequately characterized due to limitations of the techniques used. The present study aims to assess in vitro the

1
2
3 genotoxic and cytotoxic effects of artesunate on human lymphocytes using
4
5 assays such as FISHMN, oxidative stress and immunocytochemistry. The use
6
7 of such assays helped us to shed light on the genotoxic and cytotoxic
8
9 mechanisms induced by artesunate. Such mechanisms should be investigated
10
11 because genotoxic and cytotoxic effects induced by artesunate may increase
12
13 the risk of health disorders (i.e. cancer) in patients treated with such drug.
14
15

16 17 **2 Materials and Methods**

18 19 20 **2.1 Culturing isolated lymphocytes**

21
22
23 Blood samples (20 mL) were obtained by venipuncture from three
24
25 healthy 20- to 30-year-old non-smokers, two males and one female, with no
26
27 recent history of exposure to mutagens. The donors gave written informed
28
29 consent to participate in the study. Blood lymphocyte isolation was carried out
30
31 using the procedure described by Fenech [2000]. The following steps were
32
33 done: 1×10^6 cells/mL were seeded in 5 mL of RPMI 1640 medium (Cultilab,
34
35 Campinas, SP, Brazil) supplemented with 20% fetal bovine serum (Cultilab,
36
37 Campinas, SP, Brazil), 4% phytohemagglutinin A (Gibco-Invitrogen, Carlsberg,
38
39 CA, USA), 0.05 mg/mL gentamicin sulfate (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and
40
41 0.002 mg/mL amphotericin B. Cells were cultured at 37°C in an incubator
42
43 containing 5% CO₂.
44
45

46 47 48 **2.2 Culture treatment**

49
50
51 Artesunate, CAS.88495-63-0 (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), was
52
53 diluted in RPMI and added to cultures at a final concentration of 0.5, 1 or 2
54
55 µg/mL. These concentrations were chosen based on data from the literature
56
57 [Veerasubramanian et al., 2006; Kelter et al., 2007].
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2.3 Superoxide anion by nitroblue tetrazolium (NBT) assay

After 20 h in culture, lymphocytes were treated with artesunate at concentrations of 1 and 2 mg/mL, which demonstrated higher genotoxic effect according to the work of Mota et al. [2011]. After 1 h of treatment, cells were centrifuged at 800 rpm for 5 min, washed in PBS solution and incubated with 1 ml of 0.2 mg/ml NBT (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) for 2 h. After incubation with NBT, cells were centrifuged at 800 rpm for 5 min, the supernatant was discarded and 240 μ L of 2M KOH plus 280 μ L of 100% DMSO was added to the cells. Afterward, a mechanical decoupling was performed, followed by a gentle vortexing for 10 min at room temperature. In sequence, the cells were transferred to 96 well plates and the levels of superoxide radical anion quantified in a microplate reader (BioTek ELX 800) at a wavelength of 570 nm.

2.4 Total nitrite by Griess assay

Similar to the NBT assay, after 20 h in culture, lymphocytes were treated with artesunate concentrations (1 and 2 mg/mL). After 1 h of treatment, cells were centrifuged at 800 rpm for 5 min and resuspended in 1 ml 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA). Subsequently, cells were transferred to 96 well plates and stained with a Griess solution (N- (1-Naphthyl) ethylenediamine 0.1% in H₂O and 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄ in a ratio of 1:1/sample:Griess solution). After 10 min of reaction, total nitrite levels were quantified in a microplate reader (BioTek ELX 800) at a wavelength of 540 nm.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2.5 Fluorescent in situ Hybridization for Micronucleus (FISHMN)

After 20 h in culture, lymphocytes were treated with different concentrations of artesunate (1 and 2 mg / ml). Doxorubicin (0.02 mg/ml) was used as positive control. After 24 h treatment, 3 mg/mL cytochalasin-B (CTB) was added to cells. Cells were kept with CTB for 28 h, and subsequently, they were centrifuged at 800 rpm for 5 min. Cells were then treated with 5 ml of ice-cold hypotonic solution (0.075 M KCl), centrifuged and treated with 5 mL of fixative 5:1 (5 methanol: 1 acetic acid) and 3 drops of formaldehyde. A second treatment with 5 mL of fixative 3: 1 (3 methanol: 1 acetic acid) was also carried out. After fixation, slides were prepared for FISHMN. FISHMN was carried out using a mix of direct labeling centromeric probes with representatives of all human chromosomes (Cytocell Aquarius). Slides were incubated for 2 min in 2×SSC (Sodium citrate saline) at room temperature, dehydrated in increasing serial concentrations of ethanol, 70%, 85% and 100% also for 2 min and then dried at room temperature. After drying, the slides and the probes were preheated at 37°C for 5 min. A 10-µL probe was applied to each slide and they were covered with coverslips. Slides with probes were denatured by heating in a hot plate at 75°C for 2 min and sequentially transferred to a humid chamber, protected from light, and kept in an oven at 37°C for 16 h. In sequence, the slides were incubated in 0.25 × SSC at 72°C for 2 min, allowed to dry, then incubated again in 0.05% Tween 20/2 × SSC for 30 seconds. The cells were counter-stained with 20 µL DAPI antifade, kept in a humid chamber, protected from light, and kept at 37°C for 10 min. The analysis was performed with a

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

fluorescence microscope OLYMPUS BX41 with triple filter DAPI/FITC/TRITC. The capture and image analyses were performed using the "Applied Spectral Imaging" software. A total of 1.000 binucleated cells were analyzed and the micronuclei were distinguished in accordance with the presence or absence of centromeric labeling as centromere-positive (C + MN) or centromere-negative (C-MN).

2.6 Expression of Caspases 8 and 9 and Cytochrome C by Immunofluorescence

Cells were treated for 24 h with artesunate 2 mg/mL, the concentration that showed the highest cytotoxic and genotoxic effects according to Mota et al. [2011]. Doxorubicin 0.02 µg/ml was used as positive control [LUANPITPON et al., 2012]. After treatment, the cells were centrifuged at 1000 rpm for 5 min, washed three times with 1× PBS and fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde. A sample of cells (200 µL) was applied on each slide, and then, they were dried at room temperature overnight. Slides were enclosed in Styrofoam glue before the application of the sample in order to carry out the treatments and washes. Cells were permeabilized with Triton X-100 0.5% + DMSO 1% + Normal Goat Serum 5% in a humid chamber for 10 min at RT in mild agitation. A lock with 5% BSA for 50 min in mild agitation was conducted. After blocking, cells were incubated with the primary antibody 1: 200 (CASP 8 - 8CSP03/sc-56070-mouse monoclonal IgG; CASP 9 - p10 F-7/sc-17784-mouse monoclonal IgG2a and Cytochrome C - 2G8/sc-65396-mouse monoclonal IgG) in a humid chamber, protected from light at 4°C overnight. Incubation with the secondary antibody 1: 100 (Anti-Mouse IgG-specific Fab-FITC / SIGMA-Aldrich) was performed in a humid chamber, protected from light for 2 h at 4°C. Counter-staining was

1
2
3 performed with DAPI (1: 10,000) for 2 min at low brightness. After DAPI, a wash
4
5 in 1× PBS for 10 min was performed, with a drop of mounting solution
6
7 (Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium, Sigma F4680) at the surface of
8
9 the slide, followed by a coverslip. The analysis was performed with a
10
11 fluorescence microscope OLYMPUS BX41, with triple filter DAPI/FITC/TRITC.
12
13 The capture and image analyses were performed using the "Applied Spectral
14
15 Imaging" software.
16
17

18 19 **2.7 Statistical analysis**

20
21
22 The results were subjected to analysis of variance (ANOVA) followed by
23
24 the Tukey test. The BIOSTAT 5.0 software [Ayres et al., 2007] was used to
25
26 perform statistical analyses. In all the tests, the significance level was 5%.
27
28

29 30 **3 Results and Discussion**

31
32 In our experiments, we found that artesunate induced a significant
33
34 increase in both the cytosolic levels of superoxide anion radicals (O₂⁻) (p<0.05),
35
36 as the total amount of nitrite (p<0.05) (Figures 1 and 2), which demonstrates a
37
38 clear effect of the drug on the induction of oxidative stress on our experimental
39
40 model. According to Moshage et al. [2009], nitric oxide may react with O₂ to
41
42 form peroxynitrite, an extremely reactive compound and is toxic to cells, which
43
44 is capable of nitrosilate tyrosine residues, leading to the formation of modified
45
46 proteins or the inhibition of their functions and may cause DNA damage.
47
48

49
50 Our results are in agreement with Li et al. [2008], which showed that in
51
52 fact, artesunate has the ability to produce reactive oxygen species (hydroxyl
53
54 radicals and superoxide anions radicals) in certain cells through the Fenton
55
56 reaction Fe (II). In addition, according to the same authors, such radicals can
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

cause oxidative DNA damage, and these, in turn, can induce single and double strand breaks in this molecule, leading to apoptosis.

Another interesting finding regarding the involvement of artesunate in oxidative stress can be seen in the work of Gopalakrishnan & Kumar [2015]. They showed that artesunate induces the release of ROS through NADPH oxidase activation, which is involved in the production of O₂. These results are in agreement with those found in the present study, as artesunate in our experimental conditions clearly induced an increase in the levels of O₂ in lymphocytes in culture.

Cheng et al. [2013] also demonstrated in their studies the effect of artesunate on oxidative stress. They observed that this drug induces the formation of reactive oxygen species and other free radicals in different experimental models, including human vascular endothelial cells. Eling et al. [2015], in their work with pancreatic cancer cells, also observed the production of free radicals stimulated by artesunate.

Free radicals, especially the hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), the most reactive and harmful known radical (the last to be produced in the ROS release cascade starting from O₂⁻) may cause irreversible damage to the DNA molecule. The $\cdot\text{OH}$ has a great affinity for nitrogenous base guanine, generating 8-hydroxy or 8-oxoguanine, considered mutagenic metabolites. Because of these events, the hydroxyl radical induces breaks in the DNA, DNA cross-links and changes in nitrogenous bases, which may lead to mutations and apoptosis [Vasconcelos et al., 2007].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

We also investigated the genotoxic effects of artesunate that concern the clastogenicity and aneugenicity of this drug using FISHMN test. Information on the origin of micronuclei (if by clastogenicity or aneugenicity) is important to determine the cancer risk, which may be due to carcinogen-induced chromosome breakage, clastogenic carcinogen, carcinogen-induced numerical chromosome abnormality, or aneugenic carcinogen [Norppa and Falck, 2003]. Our results showed that there was a statistically significant increase ($p < 0.05$) in both C-MN rates, as C + MN at all concentrations tested, with statistical predominance of C-MN (Figure 3). Figure 4 show human lymphocytes obtained after treatment with artesunate and FISHMN assay. These findings show that the genotoxic effect of artesunate is characterized by both a clastogenic and aneugenic behavior in human lymphocytes in vitro, the former being predominant over the second because the C-MN levels were higher than C + MN.

Our findings are in agreement with Aquino et al. [2011], who found that artesunate at low concentrations (5 mg/kg) induced significant genotoxic damage in rat liver cells in vivo. In the same study, the authors found that at higher concentrations (50 and 100 mg/kg), artesunate showed clastogenic effect on the animal's bone marrow cells. From these results, the authors suggest quite a caution on the long-term use or high doses of artesunate by humans undergoing treatment of any kind with this drug. In addition to the in vivo work, Aquino et al. [2013] also studied the genotoxic effects of artesunate in HepG2, a human hepatoma cell. In this study, the authors found that artesunate induced genotoxic damage in very similar concentrations (2.5, 5 and 10 $\mu\text{g/mL}$) to those used in this study, after 24 h of exposure.

1
2
3 According to Li et al. [2008], artesunate increases γ -H2AX levels in CHO-
4
5 9 cells, albeit at higher concentrations than those used in our study. According
6
7 to the same authors, γ -H2AX is a marker for the formation of double strand
8
9 DNA breaks, which may explain the fact that the C-MN rate was greater than
10
11 the C + MN in lymphocytes exposed to the artesunate in the present work, as
12
13 this type of MN is formed by chromosomal breaks; however, this hypothesis
14
15 requires confirmation. Another study that reinforces the effect of artesunate on
16
17 the formation of DNA double strand breaks is one from Berdelle et al. [2011],
18
19 who demonstrated that artesunate induced oxidative DNA damage in human
20
21 glioblastoma cell line (LN-229) because artesunate also increases γ -H2AX
22
23 levels in these cells.
24
25
26

27
28 Kryscio et al. [2001], in a study based on the genotoxic evaluation of
29
30 uranium in lymphocytes of workers exposed to this agent for long-term, suggest
31
32 that low percentages of C + MN found in these individuals may represent an
33
34 important biomarker of genomic instability and predisposition to cancer. Another
35
36 study by Senthilkumar et al. [2015] demonstrated that individuals exposed to
37
38 methyl isocyanate showed an increase in micronucleus rate. According to the
39
40 authors, these findings suggest that such individuals have greater susceptibility
41
42 to cancer. Therefore, based on our results of increased levels of free radicals,
43
44 and with a fair support from the literature, it is tempting to assume that the
45
46 genotoxic effects of artesunate observed in the present study are due to the
47
48 oxidative stress induced by such drug.
49
50
51

52
53 Mota et al. [2011] found in their studies that artesunate is a genotoxic
54
55 and cytotoxic drug with mutagenic potential, which induces apoptosis in human
56
57 lymphocytes in vitro; however, they have not demonstrated which pathway
58
59
60

1
2
3 would induce this type of cell death. In the present study, it was observed that
4
5 treatment of cells with artesunate significantly increased ($p < 0.01$) the
6
7 expression of CASP 8 (Figure 5), CASP 9 (Figures 6) and Cytochrome-C
8
9 (Figures 7). Figure 8 show human lymphocytes after fluorescence
10
11 immunocytochemistry labelling showing the effect of artesunate (ARS) in the
12
13 expression of different apoptotic proteins. Our results suggest that artesunate
14
15 induces apoptosis in lymphocytes by both the extrinsic pathway, once we
16
17 detected an increase in the expression of CASP 8, and the intrinsic pathway,
18
19 due to the increase in the expression of CASP 9 and cytochrome C.
20
21

22
23 According to Mercer et al. [2007], cell death induced by endoperoxides
24
25 such as artesunate is a consequence of the activation of endoperoxide bridges,
26
27 a condition that results in the release of reactive oxygen species and other free
28
29 radicals, substances responsible for the activation of caspase-dependent
30
31 apoptotic pathway. In this context, Mota et al. [2011] suggest that besides being
32
33 probably responsible for the genotoxic effects, free radicals produced by the
34
35 artesunate could also be inducing cell death observed in lymphocytes treated
36
37 with such drug.
38
39

40
41 It has been observed in a work by Hou et al. [2008] that artemisinin and
42
43 dihydroartemisinin induce cytotoxicity in HepG2 cells exposed for 48 h by
44
45 inhibiting proliferation and activating apoptosis through CASP 3, an effector
46
47 caspase that can be cleaved either by CASP 8 or by CASP 9 leading to
48
49 apoptotic death. This indicates that these compounds activate the mitochondrial
50
51 apoptotic pathway preferentially.
52
53

54
55 Mercer et al. [2011] observed that in HeLa cells, artesunate induces
56
57 increased expression of CASP 3 and CASP 7. The authors also demonstrated
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

that the drug stimulates the release of cytochrome C, which consequently activates CASP 9, leading to the activation of the intrinsic apoptosis pathway. Interestingly, they also demonstrated that such cytotoxic effects might be due to the interaction of the endoperoxide group found in artesunate with heme during mitochondrial metabolism generating ROS; and that these ROS would be responsible for the cytotoxic effects found.

Our results are in agreement with the work mentioned above, as artesunate increased the expression of CASP 9 and cytochrome C in our experimental conditions, which suggests the participation of the intrinsic apoptotic pathway. In our study, we also observed the participation of the extrinsic pathway through CASP 8 activation.

The results obtained in this study showed that artesunate induces clastogenic and aneugenic effects in human lymphocytes. It was further demonstrated that this drug is cytotoxic and induces apoptosis by both the extrinsic pathway and the intrinsic pathway in lymphocytes. In our experimental conditions, we also observed that artesunate induces oxidative stress in human lymphocytes.

From the results of the present study, one can infer that artesunate induces the formation of ROS and other free radicals, and that these substances are causing DNA damage in human lymphocytes in culture. Thus, cells with damaged DNA, unable to reverse this condition, activate apoptosis through extrinsic and intrinsic pathways.

4 Statement of Author Contributions

1
2
3 Drs Bahia, Burbano, and Mota designed the study. The data presented
4
5 here were generated by Mota, Garcia, Bonfim, Portilho and Pinto. Statistical
6
7 analyses were done by Bahia and Mota. The manuscript was drafted by Bahia
8
9 and Mota, with important inputs from Burbano. All authors approved the final
10
11 manuscript.
12
13

14 15 **5 Acknowledgments**

16
17 This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de
18
19 Desenvolvimento Científico e Tecnológico) (Grant No. 576151/2008-4). T.C.M.
20
21 received a scholarship from CNPq.
22
23

24 25 **6 References**

- 26
27 Aquino I, Perazzo FF, Maistro EL. 2011. Genotoxicity assessment of the
28
29 antimalarial compound artesunate in somatic cells of mice. *Food. Chem.*
30
31 *Toxicol.* 49(6):1335-1339.
32
33 Aquino I, Tsuboy MSF, Marcarini JC, Mantovani MS, Perazzo FF, Maistro EL.
34
35 2013. Genotoxic evaluation of the antimalarial drugs artemisinin and artesunate
36
37 in human HepG2 cells and effects on CASP3 and SOD1 gene expressions.
38
39 *Genetics and Molecular Research* 12(3):2517–2527.
40
41 Arreesrisom P, Dondorp AM, Looareesuwan S, Udomsangpetch R. 2007.
42
43 Suppressive effects of the anti-oxidant N-acetylcysteine on the anti-malarial
44
45 activity of artesunate. *Parasitology International* 56:221–226.
46
47 Ayres M, Ayres MJ, Ayres DM, Dos Santos AS. 2007. *Bioestat 5.0: aplicações*
48
49 *estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.* 5th edition. Belém,
50
51 Pará.
52
53 Berdelle N, Nikolova T, Quiros S, Efferth T, Kaina B. 2011. Artesunate Induces
54
55 Oxidative DNA Damage, Sustained DNA Double-Strand Breaks, and the
56
57 ATM/ATR Damage Response in Cancer Cells. *Mol Cancer Ther* 10 (12):2224–
58
59 2233.
60
61 Cheng R, Li C, Li, C, Wei L, Li L, Zhang Y, Yao Y, Gu X, Cai W, Yang Z, Ma J,
62
63 Yang X, Gao G. 2013. The Artemisinin Derivative Artesunate Inhibits Corneal
64
65 Neovascularization by Inducing ROS-Dependent Apoptosis in Vascular
66
67 Endothelial Cells. *Biochemistry and Molecular Biology* 54(5):3400–3409.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Eling N, Reuter L, Hazin J, Hamacher-Brady A, Brady NR. 2015. Identification of artesunate as a specific activator of ferroptosis in pancreatic cancer cells. *Oncoscience* 2(5):517–532.

Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 455:81-95.

Gopalakrishnan AM, Kumar N. 2015. Antimalarial Action of Artesunate Involves DNA Damage Mediated by Reactive Oxygen Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59(1):317–325.

Hien TT, Phu NH, Mai NT, Chau TT, Trang TT, loc PP, Cuong BM, Dung NT, Vimh H, Waller DJ. 1992. An open randomized comparison of intravenous and intramuscular artesunate in severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86:584-585.

Hou J, Wang D, Zhang R, Wang H. 2008. Experimental therapy of hepatoma with artemisinin and its derivatives: in vitro and in vivo activity, chemosensitization, and mechanisms of action. *Clin. Cancer Res.* 14:5519–5530.

Kelter G, Steinbach D, Konkimalla VB, Tahara T, Ketani S, Fiebig H-H, Efferth T. 2007. Role of transferrin receptor and the ABC transporters ABCB6 and ABCB7 for resistance and differentiation of tumor cells towards artesunate. *PLoS ONE* 2(8)1–7.

Kryscio A, Ulrich Müller WU, Wojci A, Kotschy N, Grobelny S, Streffer CA. 2001. Cytogenetic analysis of the long-term effect of uranium mining on peripheral lymphocytes using the micronucleus-centromere assay. *Int J Radiat Biol* 77:1087-93.

Li PC, Lam E, Roos W, Zdzienicka MZ, Kaina B, Efferth T. 2008. Artesunate derived from traditional chinese medicine induces DNA damage and repair. *Cancer Res* 68(11):4347–4351.

Luanpitpon S, Chanvorachote P, Nimmannit U, Leonard SS, Stehlik C, Wang L, Rojanasakul Y. 2012. Mitochondrial superoxide mediates doxorubicin-induced keratinocyte apoptosis through oxidative modification of ERK and Bcl-2 ubiquitination. *Biochemical Pharmacology* 83:1643-1654.

Mercer AE, Maggs JL, Sun X-M, Cohen GM, Chadwick J, O'Neill PM, Park BK. 2007. Evidence for the Involvement of Carbon-centered Radicals in the Induction of Apoptotic Cell Death by Artemisinin Compounds. *The Journal of Biological Chemistry* 282(13):9372–9382.

Mercer AE, Copple IM, Maggs JL, O'Neill PM, Park BK. 2011. The Role of Heme and the Mitochondrion in the Chemical and Molecular Mechanisms of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Mammalian Cell Death Induced by the Artemisinin Antimalarials. *The journal of biological chemistry* 286(2):987–996.

Mota TC, Cardoso PCS, Gomes LM, Vieira PCM, Corrêa RMS, Santana PDPB, Miranda MS, Burbano RMR, Bahia MO. 2011. *In vitro* evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of artesunate, an antimalarial drug, in human lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 52:590 - 594.

Moshage H. 2009. Simple and Reliable Measurement of Nitric Oxide Metabolites in Plasma. *Clinical Chemistry* 55(10):1881-1882.

Norppa H. and Falck, GC. 2003. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 18: 221–233.

Price RN. 2000. Artemisinin drugs: novel antimalarial agents. *Expert Opin Investig Drugs* 9:1815–1827.

Ramos A, Rivero R, Visozo A, Piloto J, García A. 2002. Parthenin, a sesquiterpene lactone of *Parthenium hysterophorus* L. is a high toxicity clastogen, *Mutat Res* 514(1 - 2):19-27.

Senthilkumar CS, Akhter S, Malla TM, Sah NK, Ganesh N. 2015. Increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes contributes to cancer risk in the methyl isocyanate-affected population of Bhopal. *Asian Pac J Cancer Prev* 16 (10):4409-4419.

Vasconcellos MC, Rosa RM, Machado MS, Villela IV, Crotti AE, Lopes JL, Pessoa C, De Moraes MO, Lopes NP, Costa-Lotufo LV, Saffi J, Henriques JA. 2007. Genotoxicity of 15-deoxygoyazensolide in bacteria and yeast. *Mutat Res* 631(1):16-25.

Veerasubramanian P, Gosi P, Limsomwong C, Walsh DS. 2006. Artesunate and a major metabolite, dihydroartemisinin, diminish mitogen-induced lymphocyte proliferation and activation. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 37(5):838-847.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

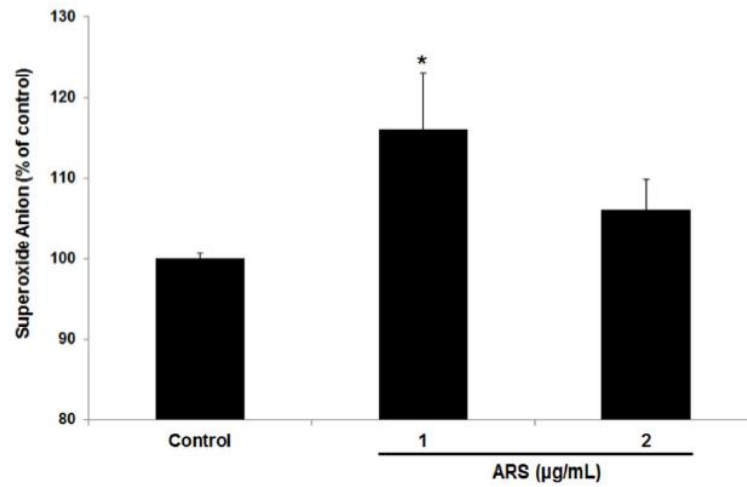


Figure 1: Effect of artesunate (ARS) in superoxide anion levels in cultured human lymphocytes analyzed by the NBT test in the period of 1 h. * $p < 0.05$ (ANOVA / Tukey post-test) compared to the control. Data are expressed as the mean values obtained from three donors; $n=3$.

239x159mm (87 x 84 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

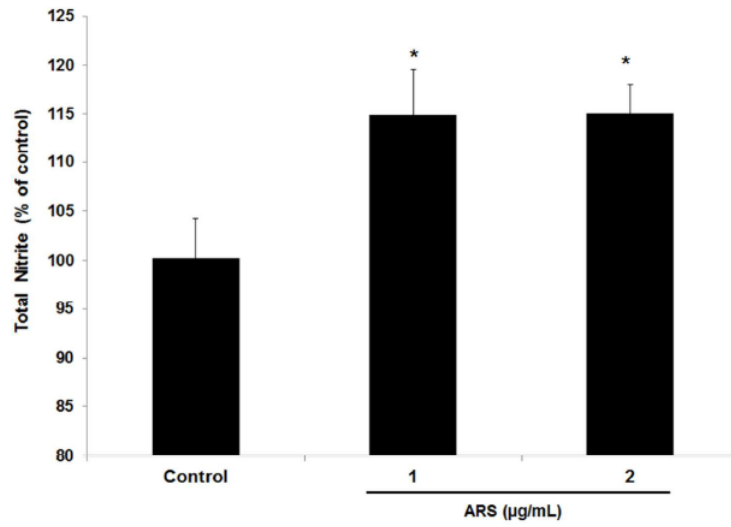


Figure 2: Effect of artesunate (ARS) on total nitrite levels in cultured human lymphocytes analyzed by Nitrite Test in the period of 1 h. * $p < 0.05$ (ANOVA / Tukey post-test) compared to the control. Data are expressed as the mean values obtained from three donors; $n=3$.

249x173mm (93 x 92 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

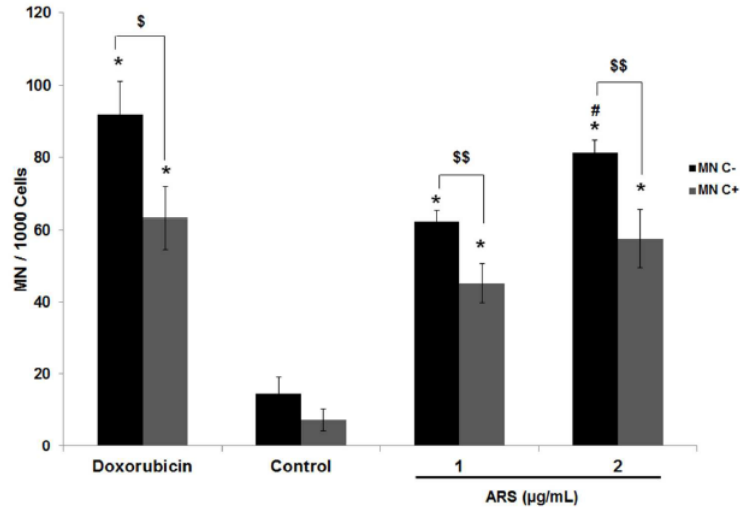


Figure 3: Effect clastogenic and aneugenic of artesunate (ARS) in cultured human lymphocytes analyzed by FISHMN assay *#\$\$\$p <0.01 and \$p <0.05 (ANOVA / Tukey post test) compared to the controls and between each treatment, taking into account the type of MN (C- and C +) . Data are expressed as the mean values obtained from three donors; n=3.

252x170mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

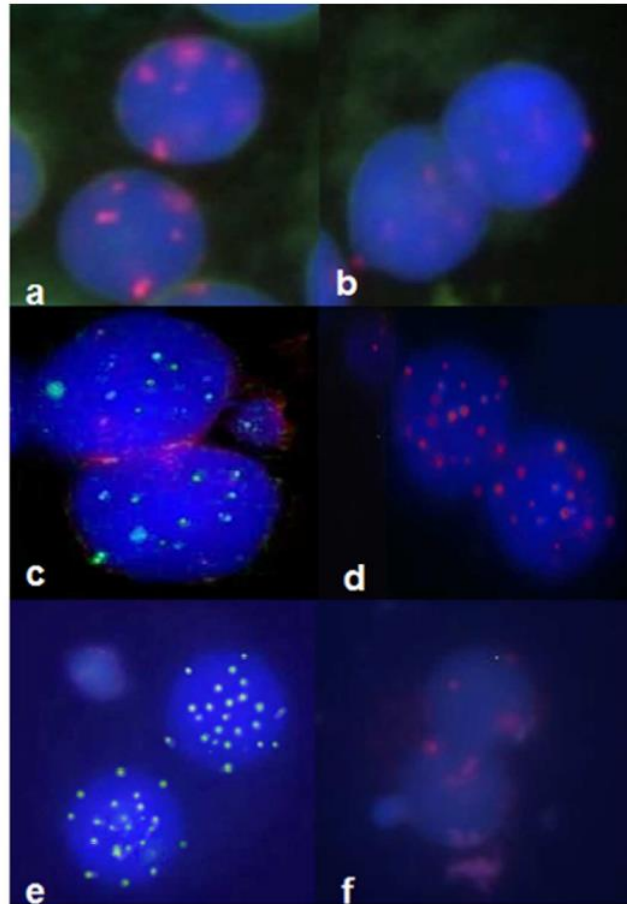


Figure 4: Photomicrograph of human lymphocytes obtained after treatment with artesunate, FISHMN was carried out using a mix of direct labeling centromeric probes with representatives of all human chromosomes. a and b: Binucleated cells without MN ; c and d: Binucleated cells with one centromere positive micronucleus (C + MN) ; e and f : Binucleated cells with one centromere negative micronucleus (C - MN).

128x188mm (81 x 81 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

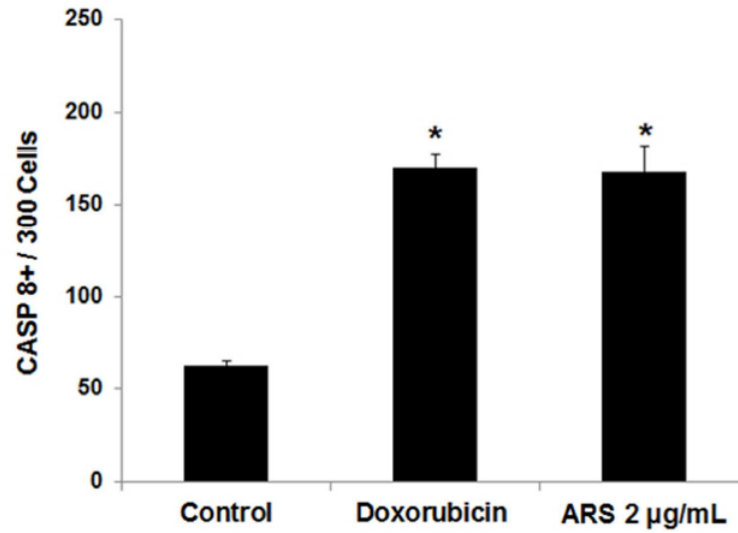


Figure 5: Effect of artesunate (ARS) in expression of CASP 8 in cultured human lymphocytes analyzed by immunocytochemistry. * $p < 0.01$ (ANOVA / Tukey post-test) compared to the control. Data are expressed as the mean values obtained from three donors; $n=3$.

211x147mm (67 x 67 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

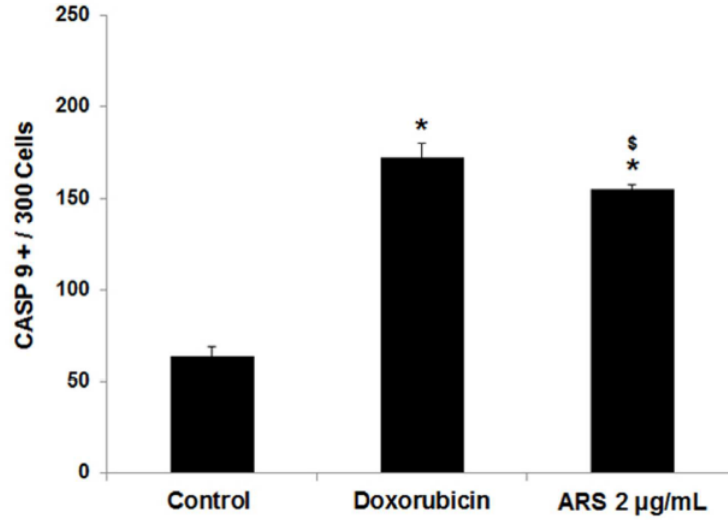


Figure 6: Effect of artesunate (ARS) in expression of CASP 9 in cultured human lymphocytes analyzed by immunocytochemistry. *p <0.01 e \$p <0,05 (ANOVA / Tukey post-test) compared to the control. Data are expressed as the mean values obtained from three donors; n=3.

211x148mm (74 x 74 DPI)

Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

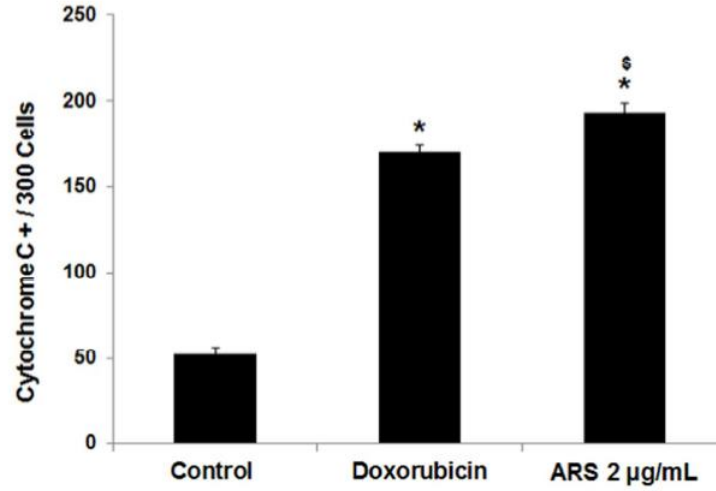
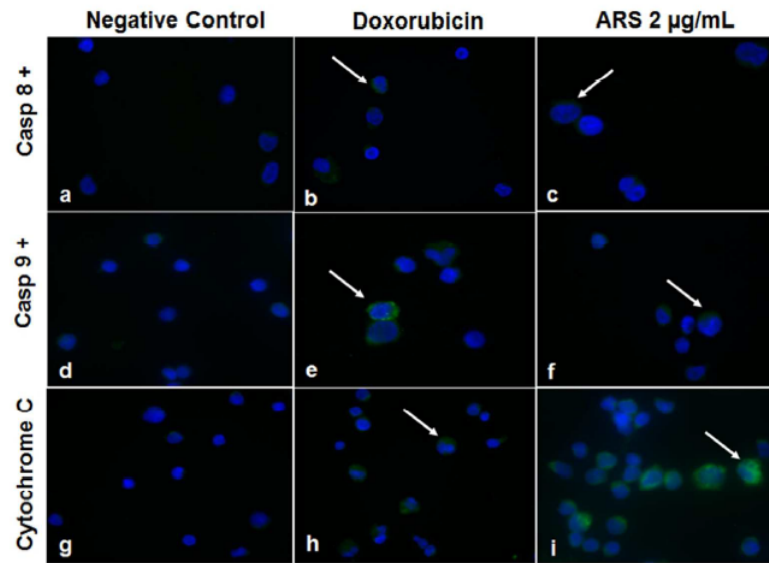


Figure 7: Effect of artesunate (ARS) in expression Cytochrome C in cultured human lymphocytes analyzed by immunocytochemistry. *\$p <0.01 (ANOVA / Tukey post-test) compared to the control. Data are expressed as the mean values obtained from three donors; n=3.

221x143mm (71 x 71 DPI)

Review



32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 8: Micrographs of human lymphocytes after fluorescence immunocytochemistry labelling showing the effect of artesunate (ARS) in the expression of different apoptotic proteins after 24 h of treatment . a, b and c: CASP 8; d, e and f: CASP 9; and g, h and i: Cytochrome C. White arrows show positive cells.

250x186mm (84 x 84 DPI)