

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

TATIANE CRISTINA MOTA

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

BELÉM

2011

TATIANE CRISTINA MOTA

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

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre 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

2011

TATIANE CRISTINA MOTA

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

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, área de concentração Biologia Celular da Universidade Federal do Pará.

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. André Salim Khayat – Instituto de Ciências Biológicas (ICB) / UFPA.

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Júlio Cesar Pieczarka – Instituto de Ciências Biológicas (ICB) / UFPA.

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Edilene Oliveira da Silva – Instituto de Ciências Biológicas (ICB) / UFPA.

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rommel Burbano (Suplente) – Instituto de Ciências Biológicas (ICB) / UFPA.

BELÉM

2011

*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 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 e seu amor.

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

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, foi ele quem me ensinou a fazer o ensaio do cometa.

À professora Dr<sup>a</sup> 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.

Ao professor Dr. Moisés Hamoy, pelo carinho, pela força, pelas dicas, pela amizade, pelo companheirismo e pela contribuição ao meu crescimento científico.

À professora MsC. Barbarella Macchi, pelas conversas, pelos conselhos, pelas críticas, pela amizade e pelo companheirismo demonstrado ao longo destes anos.

À MsC. Karen Renata, pelo apoio, pelas críticas e observações, pela amizade e por ter me ajudado nos momentos em que precisei.

À professora Dr<sup>a</sup> Gilmara, que apesar do pouco tempo em que nos conhecemos, demonstrou ser uma pessoa bastante amiga, prestativa, companheira e paciente.

À minha grande amiga Tarcyane Barata Garcia, pelo companheirismo, pela compreensão, pela alegria, pelo carinho, pelas brincadeiras, pelo apoio diário nesta caminhada 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 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.

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.

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

À todos os amigos e companheiros de Laboratório (Regianne, Priscilla, Aline, Taíssa, Lorenona, Loreninha, Diego, Hellem, Amanda, Camila, Gabi, Nayana, Henrique, Bruno, Gal, Alexandre, Leopoldo, Carlos Rocha, Joana, Taniele, Rodrigo, Glorita, Fernando e Lia) pelas conversas, pelas brincadeiras, pela alegria, pelos momentos de descontração e por estarem sempre ao meu lado quando preciso.

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

*Provérbios, 3: 13.*

## RESUMO

O artesunato representa uma das principais drogas utilizadas como antimaláricos em diversos países. É um composto semi-sintético derivado da artemisinina, substância extraída da planta chinesa *Artemisia annua* L. Apesar da ampla utilização do artesunato na terapêutica antimalárica, estudos demonstrando seus efeitos genotóxicos e citotóxicos em cultura de linfócitos humanos são ainda hoje quase inexistentes. Portanto, no presente trabalho, avaliamos os efeitos genotóxicos e citotóxicos do artesunato em cultura de linfócitos humanos. Nossos resultados demonstraram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no índice de dano avaliado pelo teste do cometa, bem como na frequência de micronúcleos em todas as concentrações testadas. Foi observado também, que o artesunato induz um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) no número de células apoptóticas dos linfócitos, tanto em 24 quanto em 48 h de tratamento. Desta forma, demonstrou-se em nosso trabalho, que o artesunato é uma droga genotóxica e citotóxica em cultura de linfócitos humanos, nas condições avaliadas.

Palavras-chave: artesunato. artemisininas. linfócitos. genotoxicidade.

## ABSTRACT

Artesunate is one of the main drugs used as antimalarials in various countries. It is a semi-synthetic compound from artemisinin, a substance extracted from the Chinese plant *Artemisia annua* L. Despite the widespread use of antimalarial artesunate in malaria treatment, studies demonstrating its cytotoxic and genotoxic effects in human lymphocytes cultures are almost nonexistent. Therefore, in this study, we evaluated the possible cytotoxic and genotoxic effects of artesunate on cultured human lymphocytes. A significant increase ( $p < 0,05$ ) in the rate of DNA damage and micronucleus frequency was observed after artesunate treatment. We also observed that artesunate induces a statistically significant increase ( $p < 0.05$ ) in the number of apoptotic cells in both 24 and 48 h of treatment. Thus, we conclude in our work that artesunate is a highly cytotoxic and genotoxic drug in cultured human lymphocytes.

Key-words: artesunate. artemisinin. lymphocytes. genotoxicity.

**LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1 - Distribuição de áreas afetadas pela malária no mundo.....	2
FIGURA 2 - <i>Artemisia annua L.</i> , planta da qual é extraída a droga antimalárica artemisinina.....	6
FIGURA 3 - Desenho esquemático da estrutura molecular da droga antimalárica artesunato.....	8
FIGURA 4 - Desenho esquemático mostrando a produção de células sangüíneas com destaque para os linfócitos.....	10
FIGURA 5 - Fotomicrografia mostrando os níveis de dano analisados pela técnica do cometa.....	18
FIGURA 6 - Desenho esquemático ilustrando a origem do micronúcleo.....	19
FIGURA 7 - Fotomicrografias ilustrando diversos aspectos de células binucleadas que se enquadram nos critérios de análise.....	21
FIGURA 8 - Fotomicrografias ilustrando células binucleadas micronucleadas.....	21
FIGURA 9 - Fotomicrografias ilustrando células binucleadas com PNP.....	22
FIGURA 10 - Fotomicrografias ilustrando células multinucleadas .....	23
FIGURA 11 - Efeito do artesunato em cultura de linfócitos humano analisado pelo ensaio do cometa.....	25

FIGURA 12 - Micrografias de células de linfócitos humanos obtidas em nossos resultados após o tratamento com artesunato e a realização do ensaio do cometa ....	26
FIGURA 13 - Efeito do artesunato em cultura de linfócitos humano analisado pelo teste do micronúcleo .....	27
FIGURA 14 - Efeito do artesunato na indução de PNP em cultura de linfócitos humanos .....	28
FIGURA 15 – Frequência de apoptose e necrose induzida por artesunato em cultura de linfócitos humanos analisada pelo ensaio da anexina V após 24 e 48 h de exposição .....	29
FIGURA 16 – Micrografias de células de linfócitos humanos obtidas em nossos resultados após o tratamento com artesunato e a realização do ensaio de Apoptose pelo método da anexina V FITC .....	30

## LISTA DE SIGLAS

AC - Aberração Cromossômica

CtB - Citocalasina B

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

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

FBS - Fetal Bovine Serum (Soro Bovino Fetal)

FISHMN - Hibridação Fluorescente *In Situ* para Micronúcleo

FITC – Fluorescein Isothiocyanate (Isotiocianato Fluoresceína)

ID – Índice de Dano ao DNA

IDN - Índice de Divisão Nuclear

MN - Micronúcleo

NFκB – Factor Nuclear Kappa B

PBS – Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato)

PNP - Ponte Nucleoplasmática

QSH - Quinghaosu (outro nome dado às artemisininas)

TRITC – Tetramethylrhodamine Isothiocyanate (Isotiocianato Tetrametilrodamina)

**SUMÁRIO**

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Malária .....	2
1.2 Genotoxicidade de Drogas Antimaláricas .....	4
1.3 Artesunato .....	8
1.4 Cultura de Linfócitos Humanos como Modelo de Estudo .....	10
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
2.1 Objetivo Geral .....	12
2.2 Objetivos Específicos .....	12
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
3.1 Obtenção da Amostra e Delineamento Experimental .....	13
3.2 Cultura de Linfócitos Isolados .....	13
3.3 Tratamentos .....	14
3.4 Ensaio do Cometa (versão alcalina) .....	15
3.5 Teste do Micronúcleo .....	18
3.6 Teste de Apoptose pelo Método da Anexina V .....	23
3.7 Análise Estatística .....	24
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>7 PUBLICAÇÕES</b> .....	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>39</b>
<b>ANEXO 1</b> .....	<b>46</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças infectantes como a malária, febre amarela, dengue, entre outras, há muito tempo estão presentes na vida do homem (COIMBRA, 1987). Porém, ainda hoje estas doenças são motivo de preocupação para a saúde pública (WHO, 2008).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2008), 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.

A malária 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). O estado do Pará (PA) desde 1996 vem se mostrando como um dos mais afetados pela malária no Brasil, totalizando 75,4 % dos casos, sendo seguido por Rondônia (RO) e Amazonas (AM), o que ressalta a importância de estudos sobre esta doença em nosso estado (OPS/PAHO/WHO, 1997).

O tratamento da malária é baseado principalmente na administração de drogas específicas, como por exemplo, as artemisininas e seus derivados: artesunato 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 em nosso estado, uma vez que a incidência de malária é bastante grande nesta área (OLIVEIRA *et al*, 2009), o que expõe a população a um grave problema de saúde pública, pois os danos genotóxicos que por ventura possam ser provocados por essas drogas podem aumentar o risco de desenvolvimento de neoplasias em pacientes tratados com tais medicamentos (NATARAJAN, 1993).

## 1.1 MALÁRIA

A malária é uma das parasitoses mais sérias e difundidas no mundo (Figura 1), acometendo aproximadamente mais de um milhão de pessoas por ano, o que, conseqüentemente, a torna responsável pela maior causa de mortalidade e morbidade em regiões endêmicas (WHO, 2008).

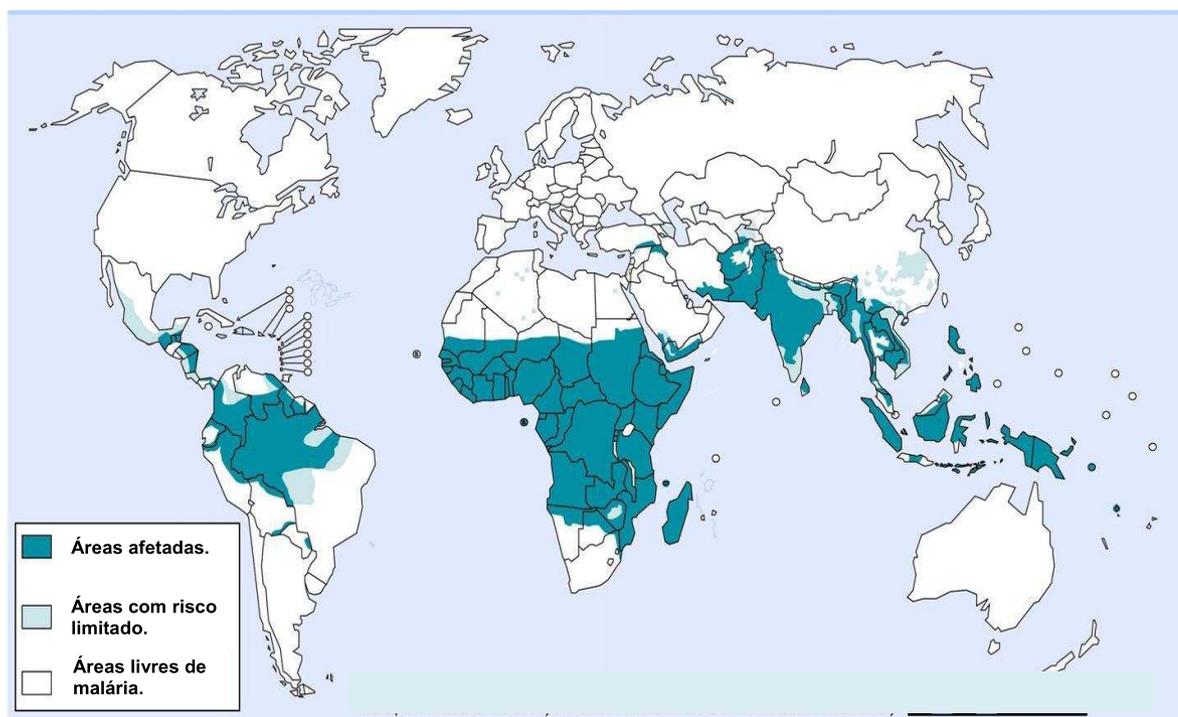


Figura 1: Distribuição de áreas afetadas pela malária no mundo (WHO, 2008).

A malária 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 plasmódios, incluindo parasitas de primatas, roedores, entre outros. Destas espécies, apenas quatro são parasitas do homem: *Plasmodium (Plasmodium) vivax*, Grassi & Feletti (1890), *Plasmodium (Plasmodium) malariae*, Grassi & Feletti (1892), *Plasmodium (Laverania) falciparum*, Welch (1897) e *Plasmodium (Plasmodium) ovale*, Stephens (1922) (LEVINE, 1988).

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 Organização Mundial de Saúde, 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). No ano de 2002 o Brasil foi responsável por cerca de 40,5 % dos 960.000 casos notificados nas Américas (PAHWO, 2002). Em 2006, já eram totalizados aproximadamente 247 milhões de casos da doença no mundo, sendo que mais de três bilhões de pessoas se encontravam em estado de risco (WHO, 2008).

O tratamento da malária é baseado principalmente na terapia com drogas específicas, sendo as artemisininas e seus derivados (artesanato e artemeter) as drogas de primeira escolha para este fim, uma vez que apresentam ótima eficiência na destruição dos parasitas. Apesar das pesquisas atuais apresentarem muitos estudos a respeito da avaliação genotóxica de medicamentos utilizados como antimaláricos, ainda são muito escassos os trabalhos que demonstrem os efeitos *in vitro* das artemisininas e seus derivados, entre eles, o artesunato, o qual será motivo de investigação neste trabalho (BOARETO *et al*, 2008; WHITE, 2008).

## 1.2 GENOTOXICIDADE DE DROGAS ANTIMALÁRICAS

É conhecido que populações humanas podem apresentar danos genéticos por exposição acidental, ocupacional ou ambiental a agentes genotóxicos químicos, físicos ou mesmo biológicos. Estes agentes podem interferir no adequado desenvolvimento da célula, causando danos em seu material genético e conferindo um grande risco para o desenvolvimento de doenças, como por exemplo, as neoplasias (NATARAJAN, 1993).

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

Os danos no DNA induzidos por diversos agentes mutagênicos podem ser reparados ou processados, porém, muitos deles podem levar à formação de AC, as quais podem ser estáveis ou não. As primeiras referem-se a pequenos 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), o que ressalta a importância da avaliação genotóxica de substâncias usadas como medicamentos, como por exemplo, as artemisininas.

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 substâncias 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, na presença de alguns antimaláricos, como as artemisininas, ocorre a formação de um metabólito com grande potencial redox, o qual é proveniente da reação entre a droga e o grupamento heme. Este metabólito promove 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 (BERMAN; ADAMS, 1997).

A artemisinina, também conhecida como quinghaosu (QSH), é um composto natural extraído da planta chinesa *Artemisia annua* L. (Figura 2) (LIU *et al*, 1979). Esta substância foi isolada há mais de 30 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 2: *Artemisia annua L.*, planta da qual é extraída a droga antimalárica artemisinina (<http://users.unimi.it/farmacogiornale/extra/gazette006.html>).

Segundo He *et al.* (2010), os sesquiterpenos são substâncias que têm atraído grande interesse científico pelo fato de apresentarem atividades biológicas importantes como, antifúngicos, citotóxicos, entre outros. Vasconcellos *et al.* (2007) sugeriram fortes evidências do efeito genotóxico das lactonas sesquiterpênicas, uma vez que verificaram que o composto 15-deoxigoiazensolida induz mutações em *Sacharomyces cerevisiae*. 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 (ZER), 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 aberrações 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.

### 1.3 ARTESUNATO

O artesunato (Figura 3) 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).

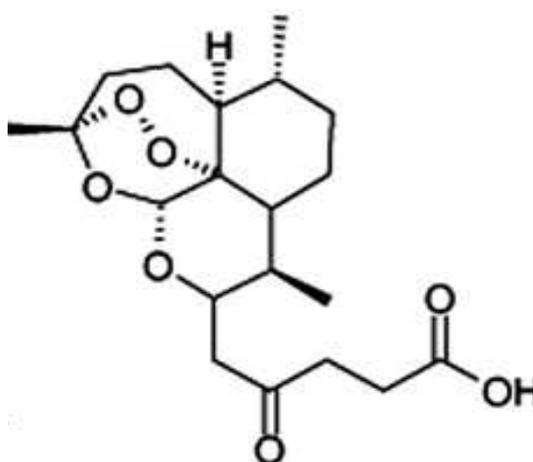


Figura 3: Desenho esquemático da estrutura molecular da droga antimalárica artesunato (KONKIMALLA *et al*, 2008).

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. 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 uma década (EFFERTH *et al.*, 1996), os mecanismos moleculares pelos quais esta droga exerce sua atividade anti-neoplásica não estão bem elucidados (EFFERTH *et al.*, 2007). Estudos mais recentes 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 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 4, eles são produzidos na medula óssea e estão presentes em grande quantidade na corrente sanguínea, na linfa (fluido incolor presente nos vasos linfáticos, que conectam os linfonodos do organismo uns com os outros e com a corrente sanguínea) e nos órgãos linfóides (ALBERT *et al*, 2004).

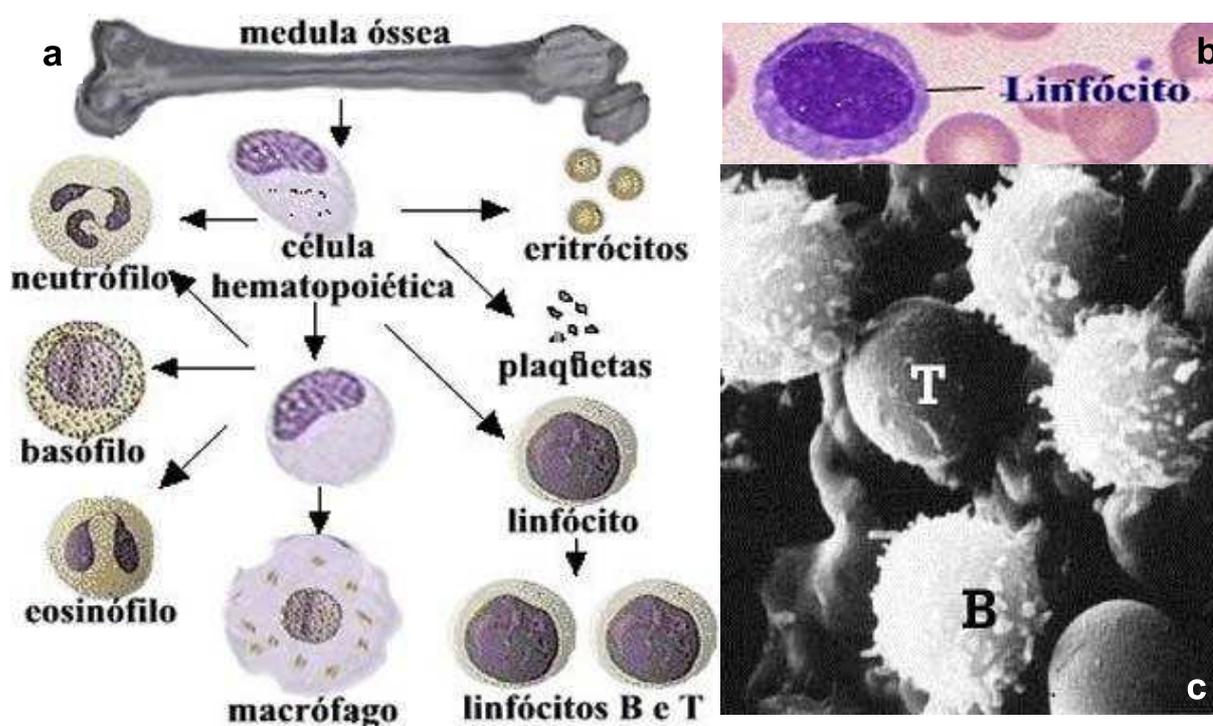


Figura 4: (a) Desenho esquemático mostrando a produção de células sanguíneas com destaque para os linfócitos; (b) observa-se uma fotomicrografia com um linfócito corado com Giemsa; e em (c), observa-se uma fotomicrografia de microscopia de varredura evidenciando linfócitos do tipo T e B (<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/corpo-humano-medula-ossea/corpo-humano-medula-ossea-3.php>).

Devido a sua grande abundância na corrente sanguínea, os linfócitos em cultura 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 aberrações cromossômicas), quanto os moleculares (FISH), o que ressalta a utilidade destes modelos em estudos de genotoxicidade, como o aqui proposto.

Portanto, devido à escassez de estudos acerca do potencial genotóxico do artesunato e ao fato do mesmo ser extensivamente utilizado como antimalárico, torna-se de importante o desenvolvimento do presente estudo, pois os danos genotóxicos que por ventura possam ser gerados por esta droga, podem aumentar o risco de carcinogênese em pacientes submetidos ao tratamento com ela. A expectativa é de que os resultados produzidos nesta dissertação possam fornecer subsídios que colaborem no sentido de implementar estratégias de tratamento mais rígidas e multidisciplinares no controle da malária.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

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

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Avaliar o índice de dano ao DNA demonstrado pelas células após o tratamento com as diferentes concentrações de artesunato utilizando o ensaio do cometa;
- ❖ Avaliar a frequência de micronúcleos em cultura de linfócitos periféricos humanos tratados com diferentes concentrações de artesunato utilizando a técnica do micronúcleo convencional;
- ❖ Avaliar a viabilidade celular após tratamento com o artesunato utilizando a técnica de Apoptose pelo método da anexina V.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As amostras de sangue periférico foram coletadas de 3 (três) indivíduos, sendo duas mulheres e um homem (23, 27 e 24 anos respectivamente), os quais obedeciam aos padrões exigidos para a realização de testes genotóxicos. Os voluntários foram entrevistados e forneceram consentimento escrito de participação no estudo. O sangue foi coletado com o auxílio de seringas descartáveis de 20 mL, devidamente heparinizadas para evitar a coagulação, sendo em seguida submetido ao processo de isolamento de linfócitos para a preparação da cultura, a qual foi realizada de acordo com o descrito por Fenech (2000), com algumas modificações feitas em nosso laboratório.

#### 3.2 CULTURA DE LINFÓCITOS ISOLADOS

O sangue periférico foi coletado e, em seguida, diluído na proporção de 1:1 em solução salina estéril 0,85 %. A amostra foi homogeneizada por inversão e submetida a uma nova diluição em Histopaque-<sup>®</sup>1077 (específico para o isolamento de linfócitos T) na proporção de 3:1 (1 parte de Histopaque-<sup>®</sup>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 é a formação de quatro camadas, com o plasma na porção superior seguido de uma fina camada mais esbranquiçada de linfócitos, outra um pouco mais clara contendo Histopaque e por último, na porção inferior, uma camada de glóbulos vermelhos. O conteúdo (plasma + linfócitos) foi coletado e transferido cuidadosamente para outro tubo com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril. Em seguida, o material foi homogeneizado com a mesma pipeta Pasteur e então diluído em solução de Hanks (1X) estéril na proporção de 3:1 (3 partes de Hanks: 1 parte da

mistura de plasma + linfócitos). 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, sendo novamente submetido a 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 fornece a quantidade de células para cada 1 mL da suspensão obtida. Ao final de todas estas etapas, foram cultivadas  $1 \times 10^6$ /mL de células em 5 mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 20 % FBS e 4 % de Fitohemaglutinina A, uma substância mitogênica que faz com que as células retomem o seu potencial mitótico. A cultura foi incubada em estufa com 5 % de CO<sub>2</sub> a uma temperatura de 37°C.

### 3.3 TRATAMENTOS

O artesunato CAS no. 88495-63-0 (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) utilizado no presente estudo foi diluído em meio RPMI, sendo 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 ENSAIO DO COMETA (VERSÃO ALCALINA)

#### 3.4.1 Princípio da Técnica

Esta técnica foi desenvolvida por Singh *et al.* (1988) e, posteriormente, modificada por Anderson *et al.* (1994). Corresponde a um ensaio de grande sensibilidade para a detecção de vários tipos de danos no DNA (quebra de fitas duplas ou simples, danos oxidativos e ligações cruzadas) induzidos por compostos genotóxicos e mutagênicos. Partindo-se do pressuposto de que o DNA encontra-se fortemente compactado dentro do núcleo, formando alças de 5-200 Kpb, as quais se encontram aderidas a uma rede protéica ou matriz nuclear (COOK; BRAZELL, 1976; COOK *et al.*, 1978; RAZIN *et al.*, 1995; ERIKSSON *et al.*, 2002); se células embebidas em agarose tiverem suas membranas lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares (incluindo as histonas) extraídas com altas concentrações de sais, o DNA, sendo maior e mais pesado que o restante dos componentes ocupará um espaço no gel, o qual era anteriormente preenchido pela célula e será retido em uma estrutura residual semelhante a um núcleo denominada nucleóide (COOK; BRAZELL, 1976). Desta forma, o nucleóide é por definição, uma série de alças superenoveladas de DNA desprovido de histonas, aderidas à matriz nuclear residual do tamanho do núcleo da célula. Portanto, caso existam quebras na molécula de DNA, a estrutura do nucleóide sofrerá mudanças, uma vez que as alças de DNA se desenovelam, tornando-se mais frouxas e formando um halo (COOK; BRAZELL, 1976; COOK *et al.*, 1978; VOGELSTEIN *et al.*, 1980).

### 3.4.2 Procedimento Experimental

#### 3.4.2.1 Preparação das Lâminas

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

#### 3.4.2.2 Eletroforese

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

Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas rapidamente em H<sub>2</sub>O destilada gelada (4°C) para a remoção dos resquícios da solução de eletroforese, sendo, em seguida, transferidas para um novo mergulho em H<sub>2</sub>O destilada gelada por 5 min para a neutralização.

#### 3.4.2.3 Coloração

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

#### 3.4.2.4 Análise das Lâminas

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX41, contendo três filtros (DAPI/FITC/TRITC). O sistema de captura e a análise da imagem foram realizados pelo programa “Applied Spectral Imaging”. A análise foi realizada segundo o padrão de escores (Figura 5), em que, de acordo com o tamanho e intensidade da cauda do cometa (halo), podem ser obtidas cinco categorias (0 - 4), levando-se em consideração a percentagem de DNA na cauda do cometa, o que irá indicar o grau de lesão sofrido pela célula (MALUF; ERDTMANN, 2000).

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

O índice de dano ao DNA (ID) foi calculado multiplicando-se o número de células em cada nível pelo escore ao qual ela se enquadra (0, 1, 2, 3 ou 4), somando

esses valores, e por fim, o resultado obtido deve ser dividido por 100, que corresponde ao total de células analisadas.

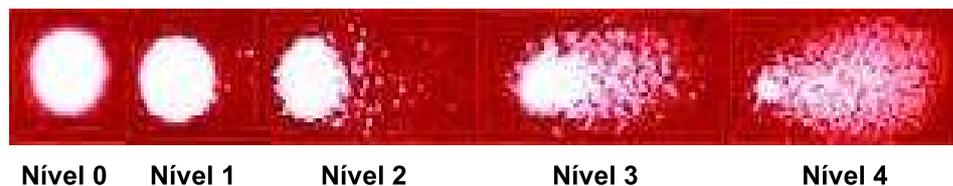


Figura 5: Fotomicrografia mostrando os níveis de dano analisados pela técnica do cometa (<http://images.google.com.br>).

### 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 6) que se atrasam em relação aos demais durante a anáfase; revelando assim a ação de agentes aneugênicos (alterações cromossômicas numéricas) e clastogênicos (alterações cromossômicas estruturais). Representa, portanto, um marcador simples, que pode ser examinado em preparações citológicas de rotina, sendo a técnica considerada bastante valiosa na avaliação de danos citogenéticos de populações ocupacionalmente expostas a agentes mutagênicos e carcinogênicos. A distinção de micronúcleos originados a partir de cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos pode ser feita através da técnica de Hibridação Fluorescente *in Situ* para Micronúcleo (FISHMN) utilizando-se sondas pan-centroméricas (RABELLO-GAY *et al.*, 1991; LINDBERG *et al.*, 2008).

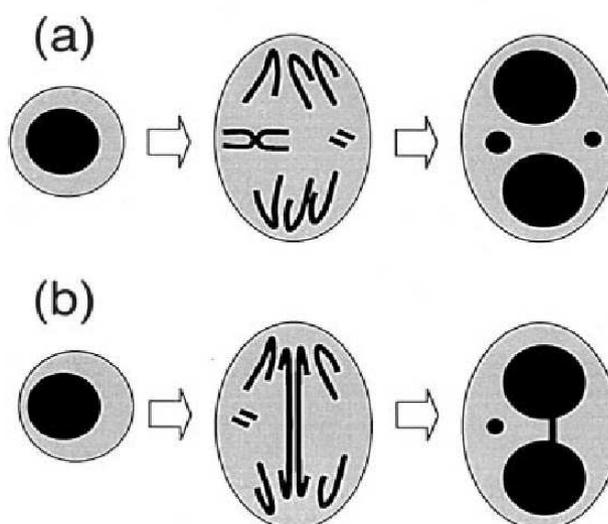


Figura 6: Desenho esquemático ilustrando a origem do micronúcleo. Em (a), dois micronúcleos, um proveniente de fragmento cromossômico acêntrico e outro oriundo de cromossomo inteiro; e em (b), a formação de uma ponte nucleoplasmática e de um micronúcleo a partir de fragmento cromossômico (adaptado de 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 feitos um controle negativo somente com meio de cultura e um controle positivo com 0,02  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de doxorrubicina, uma droga reconhecidamente genotóxica (BAUMGARTNER *et al*, 2004). Passadas 24 h do tratamento (44 h de incubação após o início da cultura), foi adicionado à cultura 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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 24 h com CtB (72 h de incubação após o início da cultura), as células foram transferidas para tubos de centrifuga e centrifugadas a 800 rpm por 5 min. O sobrenadante foi

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

### **3.5.3 Critérios Para a Seleção das Células (Fenech, 2000)**

Para a seleção das células a serem analisadas foram utilizados os critérios observados na Figura 7.

- 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.

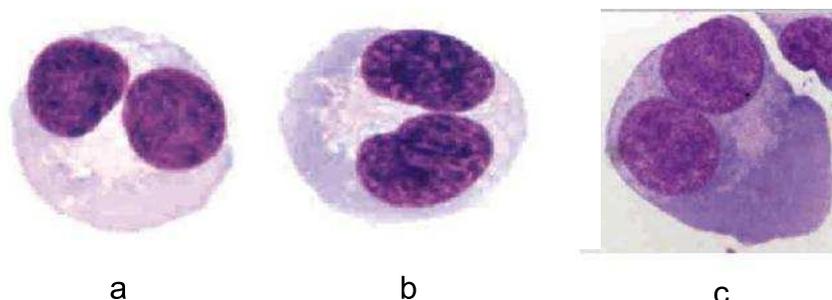


Figura 7: Fotomicrografias ilustrando diversos aspectos de células binucleadas (coradas com Giemsa) que se enquadram nos critérios de análise. Em (a) núcleos arredondados; (b) núcleos ovais; e (c) mostra o limite entre duas células adjacentes (adaptado de FENECH, 2000).

### 3.5.4 Análise dos Micronúcleos (MN)

A análise foi realizada em 1000 células binucleadas para cada um dos diferentes grupos avaliados (controles negativo e positivo, e as três concentrações de artesunato), 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 sobrepôr aos núcleos principais (FENECH, 2000) (Figura 8).

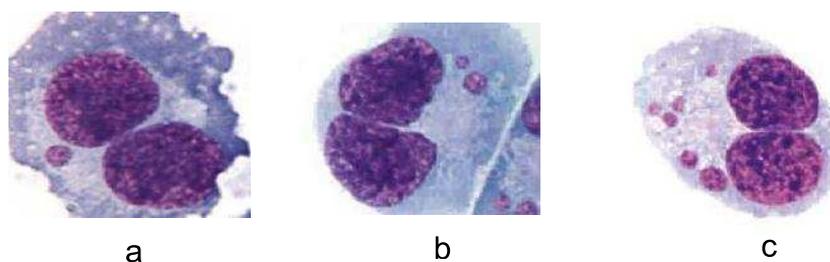


Figura 8: Fotomicrografias ilustrando células binucleadas micronucleadas (coradas com Giemsa) com um (a), dois (b) e seis (c) micronúcleos. Todas as células obedecem aos critérios de análise para micronúcleo (adaptado de FENECH, 2000).

### 3.5.5 Análise das Pontes Nucleoplasmáticas (PNP)

A frequência de pontes nucleoplasmáticas foi avaliada em 1000 células binucleadas. 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 (FENECH, 2000) (Figura 9).

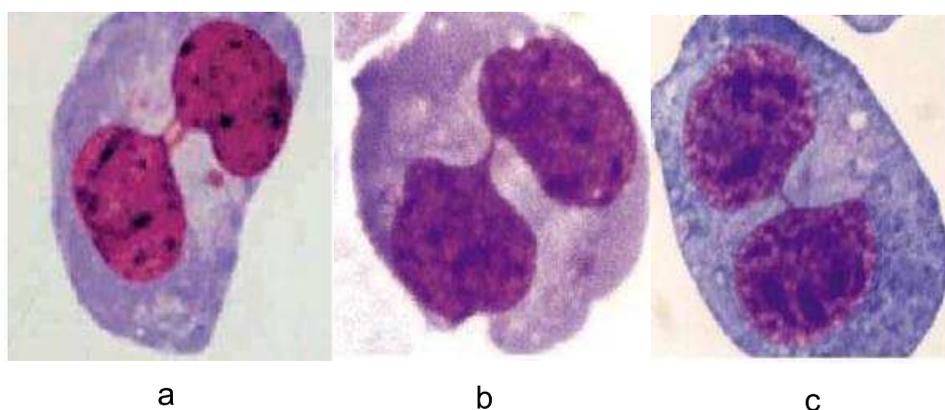


Figura 9: Fotomicrografias ilustrando células binucleadas (coradas com Giemsa) com PNP. Em (a) observa-se duas PNP e em (b) e (c) apenas uma (adaptado de FENECH, 2000).

### 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 (FENECH, 2000) (Figura 10).

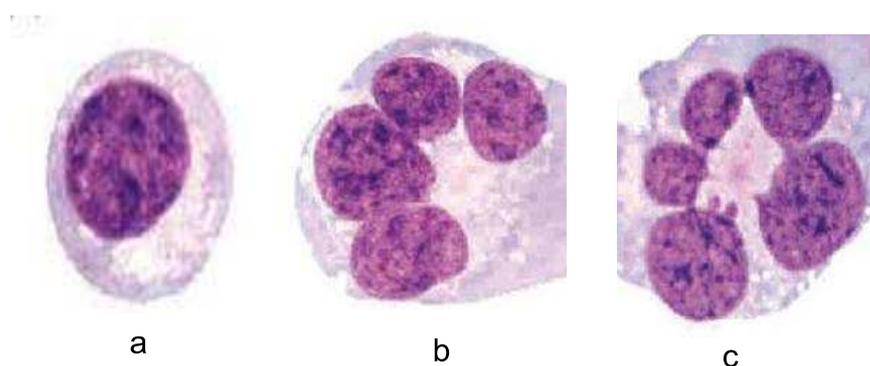


Figura 10: Fotomicrografias ilustrando células multinucleadas (coradas com Giemsa). Em a: uma célula mononucleada; b: uma tetranucleada; e em c: uma célula multinucleada com 5 núcleos (adaptado de FENECH, 2000).

### 3.6 TESTE DE APOPTOSE PELO MÉTODO DA ANEXINA V

#### 3.6.1 Princípio da Técnica

O ensaio baseado na anexina V é um procedimento clássico para a detecção de apoptose. A Anexina V é uma proteína dependente de cálcio que se liga a fosfolipídios, sendo uma de suas características principais, a sua afinidade pelo fosfolipídio de membrana fosfatidilserina (PS). Uma das primeiras características da apoptose é a translocação da PS da camada interna para a externa da membrana plasmática, o que expõe tal molécula aos fagócitos presentes no ambiente externo da célula. Desta forma, a anexina V se liga às fosfatidilserinas expostas na superfície celular e identifica as células em um estágio inicial de apoptose. O kit de anexina V (Calbiochem, Darmstadt, Germany) também utiliza o corante fluorescente iodeto de propídio, o qual tem por finalidade determinar as células que perderam a integridade da membrana, uma indicação de apoptose tardia ou necrose. Portanto, as células coradas em azul (Hoesht), são consideradas viáveis; as coradas em verde (anexina), são classificadas como apoptóticas iniciais; as coradas em vermelho (Iodeto de propídio), são classificadas como necróticas e as coradas em verde e vermelho, são ditas apoptóticas tardias (Engeland *et al.*, 1998).

### 3.6.2 Procedimento Experimental

Após 20 h em cultura, os linfócitos foram tratados com as diferentes concentrações de artesunato (0,5; 1 e 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), sendo o ensaio realizado em dois tempos experimentais (24 e 48 h). Desta forma, após 24 h e/ou 48 h de tratamento, as células foram transferidas para eppendorfs de 1,5 mL e em seguida centrifugadas a 2000 r.p.m por 5 min. O sobrenadante foi removido, as células ressuspensas em 500  $\mu\text{L}$  de PBS e levadas novamente para centrifugação a 2000 rpm por 5 min. Após este processo, o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 200  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação 1X (componente do Kit de Anexina V). Em seguida, as células foram centrifugadas mais uma vez a 2000 rpm por 5 min. Após esta etapa, o sobrenadante foi removido e as células incubadas em 50  $\mu\text{L}$  de solução de anexina V 1 % (diluída em tampão de ligação 1X associado ao reagente de ligação presente no Kit) por um período de 10 min a 4 °C. Após este tempo, foram adicionados à amostra 2  $\mu\text{L}$  de iodeto de propídio e 2  $\mu\text{L}$  de Hoesht, e as células novamente incubadas por 10 min a 4 °C. Vale ressaltar que estes procedimentos com os corantes fluorescentes foram feitos todos na ausência de luz. Terminado o período de incubação, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  da suspensão de células nas lâminas, as quais em seguida foram cobertas com lamínulas para a realização das análises em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX41, com filtros para DAPI/FITC/TRITC. No total foram analisadas 300 células em cada lâmina.

### 3.7 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

### 4.1 EFEITO DO ARTESUNATO EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS ANALISADO PELO ENSAIO DO COMETA

Após três horas de tratamento das culturas com o artesunato, observou-se um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no índice de dano ao DNA das células em todas as concentrações estudadas em relação ao controle negativo. Este aumento foi dependente da concentração da droga. O índice de dano ao DNA do controle negativo também diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) do índice das células tratadas com a doxorrubicina (Figura 11).

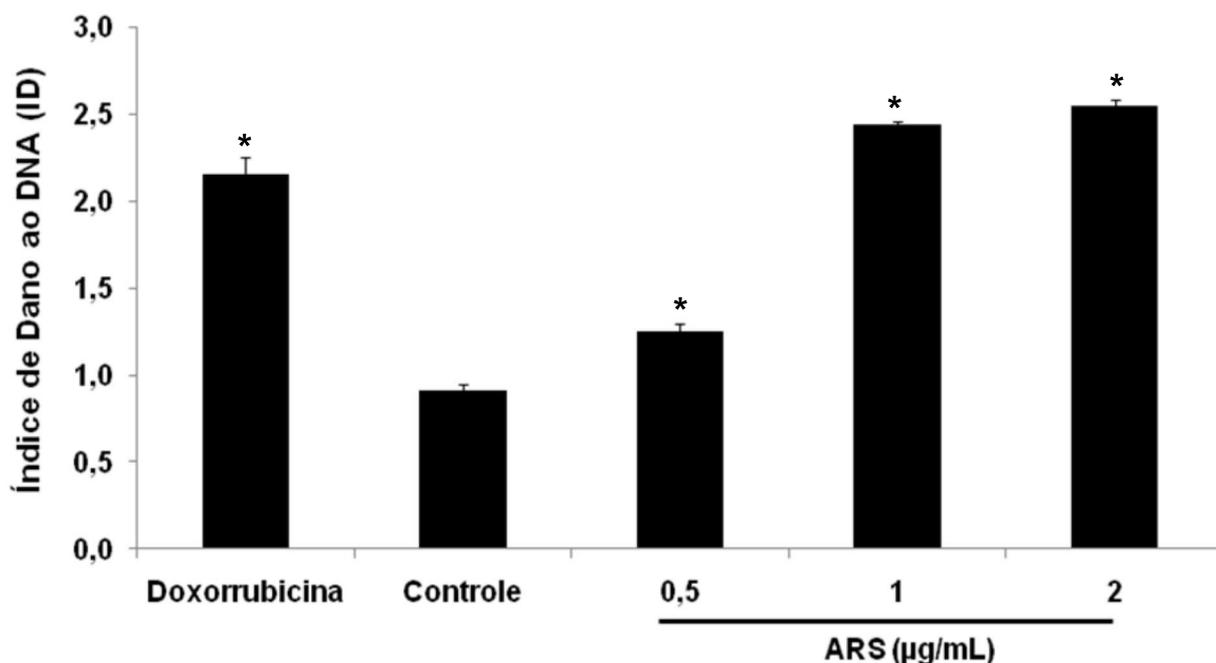


Figura 11: Efeito do artesunato (ARS) em cultura de linfócitos humanos analisado pelo ensaio do cometa. \* $p < 0,05$  (ANOVA/pós-teste Tukey) em relação ao controle.

Abaixo na figura 12, observa-se o padrão de cometas obtidos em nossos ensaios, em que nitidamente conseguimos fazer a distinção de escores adotados em nossas análises.

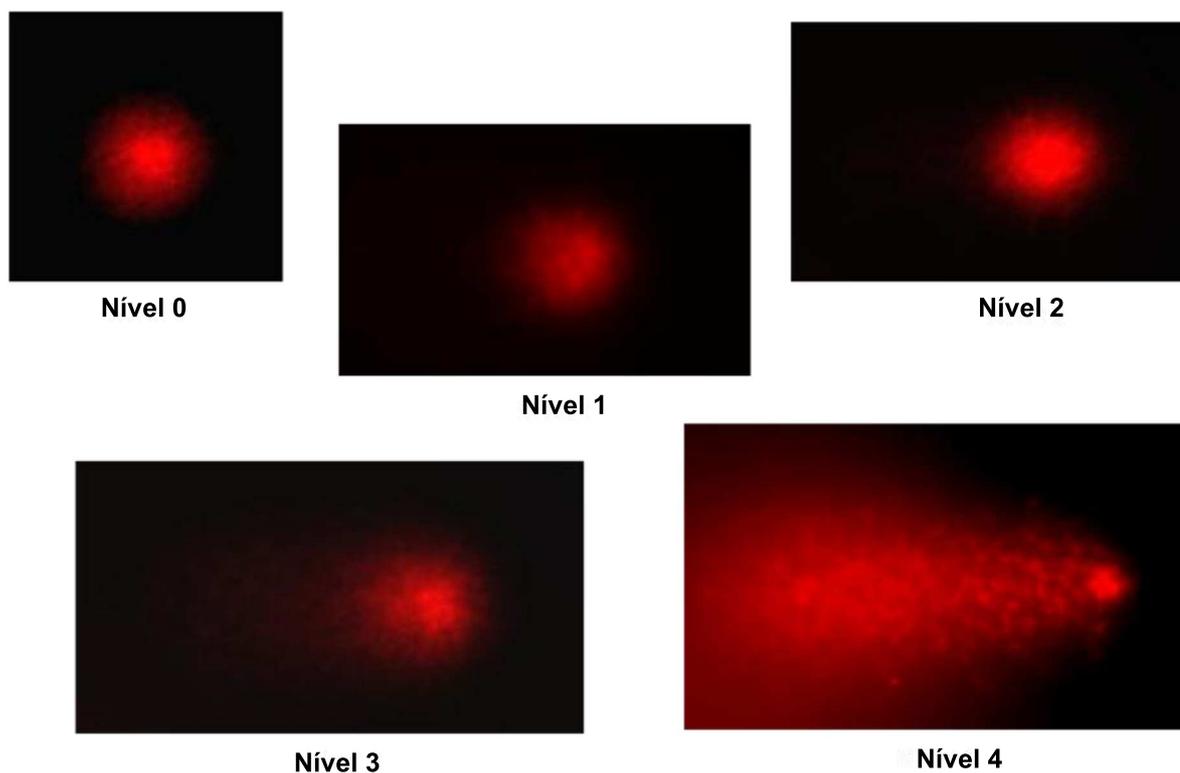


Figura 12: Micrografias de células de linfócitos humanos obtidas em nossos resultados após o tratamento com artesunato e a realização do ensaio do cometa.

#### 4.2 EFEITO DO ARTESUNATO EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS ANALISADO PELO TESTE DO MICRONÚCLEO

Quanto ao teste do micronúcleo observou-se um comportamento semelhante ao ensaio do cometa com um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na frequência de MN em todas as concentrações testadas, sendo este aumento também dependente da concentração da droga. O controle negativo também diferiu significativamente do positivo (doxorubicina) (Figura 13).

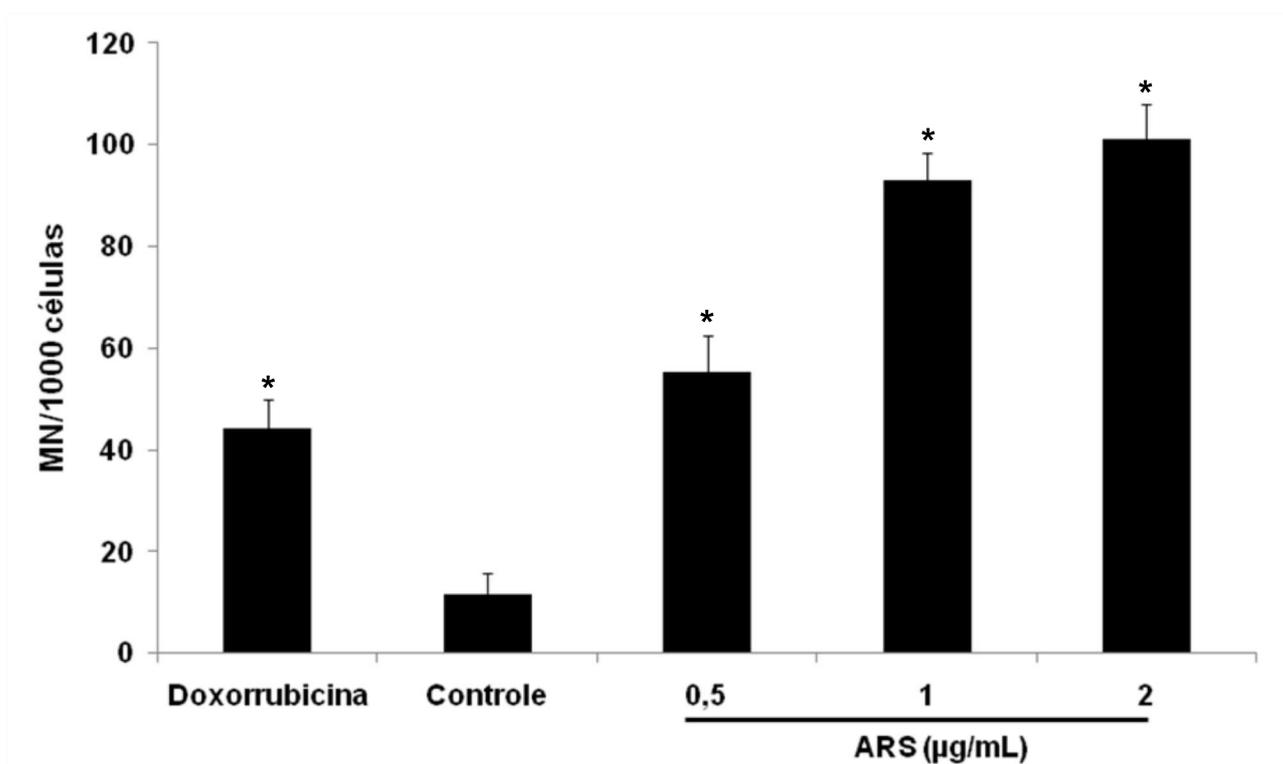


Figura 13: Efeito do artesunato (ARS) em cultura de linfócitos humanos analisado pelo teste do micronúcleo. \* $p < 0,05$  (ANOVA/pós-teste Tukey) em relação ao controle.

Com relação aos outros parâmetros analisados pelo teste do MN, foi demonstrado um aumento na indução de PNP das células em estudo, porém, com diferença estatística somente na concentração de 2  $\mu\text{g/mL}$  em relação ao controle (Figura 14). Quanto ao IDN, verificou-se uma tendência na diminuição da taxa de divisão celular dos linfócitos de acordo com o aumento da concentração de

artesanato, no entanto, não houve mudança significativa em relação ao controle negativo (Tabela 1).

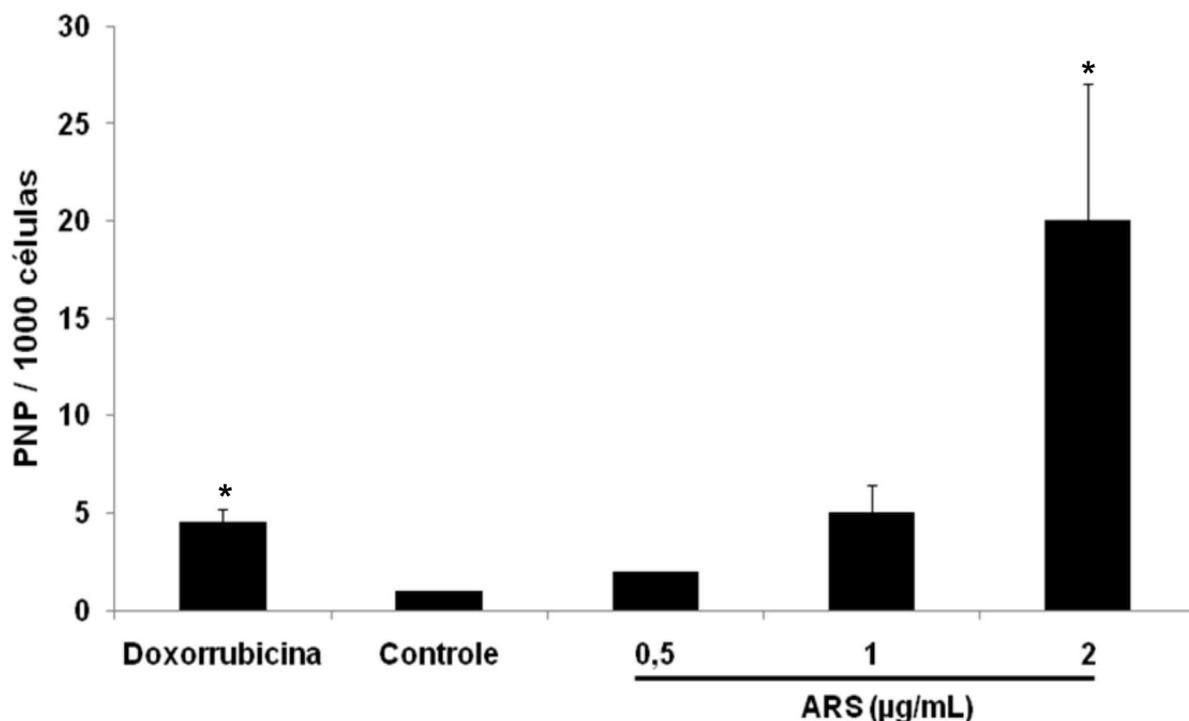


Figura 14: Efeito do artesunato (ARS) na indução de PNP em cultura de linfócitos humanos analisado pelo teste do micronúcleo. \* $p < 0,05$  (ANOVA/pós-teste Tukey) em relação ao controle.

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

Índice de Divisão Nuclear (IDN)					
		ARS (µg/ml)			
Indivíduos	Doxorrubicina				
	Controle	(0,02 µg/ml)	0,5	1	2
I 1	1,48	1,53	1,55	1,42	1,38
I 2	1,60	1,62	1,50	1,38	1,46
I 3	1,33	1,60	1,65	1,44	1,44
<b>Média</b>	1,47	1,58	1,56	1,42	1,43
<b>Desvpad</b>	±0,14	±0,05	±0,08	±0,03	±0,04

### 4.3 EFEITO DO ARTESUNATO NA VIABILIDADE DE LINFÓCITOS HUMANOS ANALISADO PELO ENSAIO DA ANEXINA V

Quando analisada a viabilidade celular após o tratamento com artesunato, percebeu-se que tanto em 24 quanto em 48 h houve um aumento significativo no número de células apoptóticas em todas as concentrações testadas e de forma dependente da concentração. No que diz respeito às células necróticas, observou-se em 24 h um comportamento semelhante ao de células apoptóticas, com aumento significativo em todas as concentrações de ARS. Em contrapartida, em 48 h, o aumento no número de células necróticas só demonstrou-se significativo em 1 e 2  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 15).

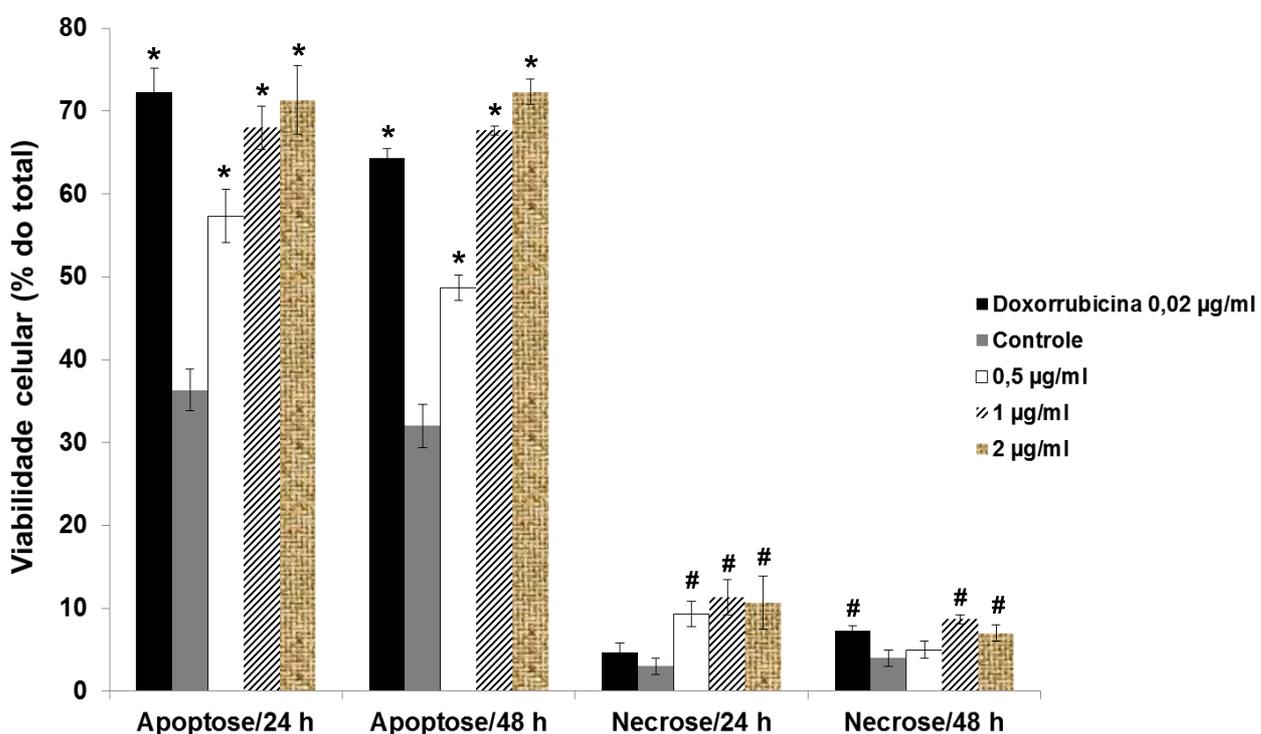
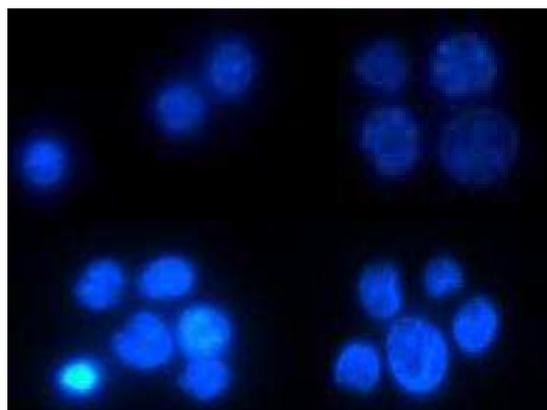
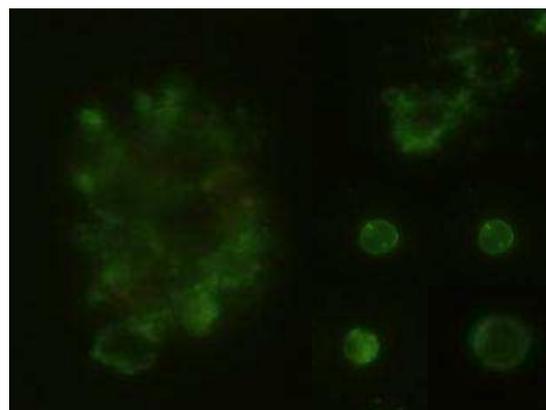


Figura 15: Frequência de apoptose e necrose induzida por artesunato (ARS) em cultura de linfócitos humanos analisados pelo ensaio da anexina V após 24 e 48 h de exposição. \*\* $p < 0,05$  (ANOVA/pós-teste Tukey).

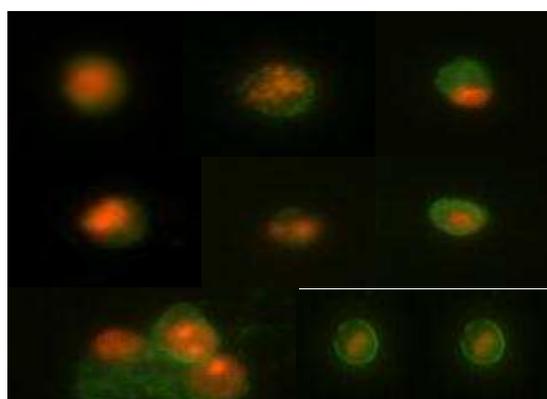
Na figura 16, observa-se o padrão de células normais, apoptóticas e necróticas obtidas em nossos experimentos, em que por meio da distinção do padrão de fluorescência, conseguimos nitidamente classificá-las e assim realizar nossas análises.



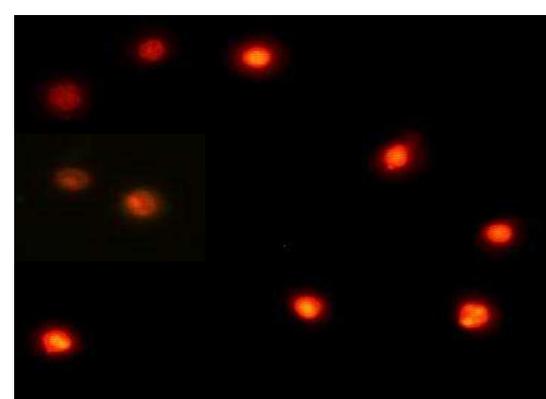
**Células Normais**



**Apoptose Inicial**



**Apoptose Tardia**



**Necrose**

Figura 16: Micrografias de células de linfócitos humanos obtidas em nossos resultados após o tratamento com artesunato e a realização do ensaio de Apoptose pelo método da anexina V FITC.

## 5 DISCUSSÃO

A malária é uma das doenças parasitárias mais sérias e mais difundidas no mundo havendo inúmeras drogas utilizadas em seu tratamento (WHO, 2008). No entanto, muitas delas não têm o seu potencial genotóxico devidamente estabelecido. Neste caso incluem-se as artemisininas e seus derivados. Visto que a exposição ambiental a agentes químicos, físicos ou mesmo biológicos pode interferir no adequado desenvolvimento da célula causando danos em seu material genético (NATARAJAN, 1993), objetivamos com o presente projeto avaliar *in vitro* os efeitos genotóxicos, mutagênicos e citotóxicos do artesunato em linfócitos de sangue periférico. Os parâmetros utilizados para detecção de genotoxicidade e mutagenicidade foram os testes do cometa e micronúcleo em linfócitos binucleados, respectivamente, enquanto que para a avaliação da citotoxicidade foi utilizado o teste da anexina V.

Quando os linfócitos em cultura foram tratados com o artesunato e analisados pelo ensaio do cometa, observou-se um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) e dependente da concentração no índice de dano ao DNA destas células em todas as concentrações estudadas (Figura 11), ou seja, um claro efeito genotóxico da droga foi observado em nossas condições experimentais. No que diz respeito ao teste do micronúcleo, nossos resultados demonstraram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na frequência de MN em todas as concentrações testadas, sendo este efeito também dependente da concentração (Figura 13).

São inexistentes na literatura estudos que avaliem os efeitos genotóxicos/mutagênicos do artesunato em linfócitos. No entanto, existem trabalhos que avaliam tais efeitos induzidos por outros compostos sesquiterpênicos. Al-Zubairi *et al.* (2010), por exemplo, ao estudarem o efeito *in vitro* da zerumbona (ZER), fármaco utilizado como antiinflamatório na medicina tradicional, observaram um aumento significativo na frequência de MN em culturas temporárias de linfócitos. No

entanto, no mesmo estudo, os autores demonstraram que a zerumbona não exerceu efeito na frequência de aberrações cromossômicas.

Burim *et al.* (2001), ao testarem o potencial clastogênico da lactona sesquiterpênica centraterina em linfócitos humanos e em camundongos, observaram que, nas culturas temporárias de linfócitos humanos, esta droga induziu um aumento significativo tanto no total de aberrações cromossômicas quanto na frequência de trocas entre cromátides-irmãs. Este aumento significativo na frequência de aberrações cromossômicas também foi constatado para as concentrações testadas em camundongos. Canalle *et al.* (2001) avaliaram os efeitos genotóxicos do licnofolido (LNP), uma lactona sesquiterpênica com atividades antitumoral, tripanocida e antimicrobiana, em linfócitos humanos e células de medula óssea de camundongos Swiss. Os autores verificaram que o LNP induz um aumento significativo na frequência de aberrações cromossômicas em células expostas na fase G2 do ciclo celular em todas as culturas tratadas. Apenas a concentração mais elevada (26,67 mg/kg) mostrou um aumento significativo no número total de aberrações cromossômicas no tratamento *in vivo*.

O metabolismo das lactonas sesquiterpênicas parece não afetar a sua capacidade em produzir efeitos clastogênicos. O presente estudo evidencia esta afirmativa, uma vez que o aumento na frequência de micronúcleos foi observado em todas as condições testadas, mas sem a necessidade de ativação metabólica. Além disto, o trabalho de Burim *et al.* (2001) demonstrou efeito clastogênico de outra lactona (centraterina) tanto na condição *in vivo* quanto *in vitro*.

Em nosso estudo observamos um aumento no índice de pontes nucleoplasmáticas (PNPs) nas células tratadas com artesunato. Contudo, este aumento só foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) na concentração de 2  $\mu\text{g/mL}$  quando comparado ao controle (Figura 14). As PNPs entre núcleos em células binucleadas (BN) são provenientes de rearranjos cromossômicos complexos.

Presume-se que elas ocorrem quando os centrômeros de cromossomos dicêntricos são puxados para pólos opostos das células durante a anáfase (FENECH, 2006).

Como já descrito anteriormente, vários estudos têm demonstrado a capacidade das lactonas sesquiterpênicas em danificar o DNA, porém nenhuma evidência de interação direta entre as mesmas e a molécula de DNA foi observada. Desta forma, é possível que o DNA possa não ser uma molécula-alvo para a ação direta destas drogas, uma vez que a maioria dos estudos têm demonstrado que as lactonas atuam principalmente inibindo enzimas que desempenham um papel importante na manutenção da integridade celular e, conseqüentemente, do organismo (Burim *et al.* 2001). Assim, o efeito genotóxico observado no presente estudo pode ser explicado de outra maneira. É sabido que derivados de artemisininas, como o artesunato, tem a capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como, radicais hidroxila e ânions radicais superóxidos. Tais radicais causam danos oxidativos ao DNA e tais danos, por sua vez, induzem quebras de fitas simples e duplas no DNA, além de indução de apoptose (LI *et al.*, 2008). É possível que os efeitos genotóxicos e mutagênicos do artesunato, observados no presente estudo, estejam associados a um aumento nos níveis de ROS.

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) não estejam sendo reparadas e conseqüentemente estejam sendo convertidas em quebras de fita dupla. Estes danos evoluem para aberrações cromossômicas estruturais (NATARAJAN, 2002) e por fim, a formação das pontes nucleoplasmáticas observadas.

De acordo com Li *et al.* (2008), o artesunato aumenta os níveis de  $\gamma$ -H2AX em células CHO-9, ainda que em concentrações maiores que as utilizadas em nosso estudo.  $\gamma$ -H2AX é considerada um marcador para a formação de quebras de fita

dupla de DNA. Além disso, lactonas sesquiterpênicas, como a partenina, são conhecidas por serem clastogênicas (RAMOS *et al*, 2002).

Muitos estudos de genotoxicidade já foram também realizados com drogas antimaláricas não sesquiterpênicas. A maior parte destes estudos aponta para um efeito genotóxico destas drogas. Traore *et al.* (2000), demonstraram em seus estudos que o antimalárico extraído de *Nauclea latifolia* induz aumento no índice de dano ao DNA de linfócitos humanos, sendo desta forma considerado uma substância potencialmente genotóxica e mutagênica. Estes dados estão de acordo com os nossos resultados, uma vez que o artesunato também apresentou efeito genotóxico no mesmo modelo experimental.

Efeitos genotóxicos também foram demonstrados pelo antimalárico pirimetamina em diferentes modelos experimentais (fígado, rim e pulmão de rato) tanto na condição *in vivo*, quanto *in vitro*. Sasaki *et al.* (1997), perceberam que, assim como o artesunato, esta droga induz aumento no índice de dano ao DNA das células em estudo. Esses dados reforçam a sensibilidade e a importância da técnica do cometa na avaliação de substâncias terapêuticas quanto ao seu potencial genotóxico em diversos modelos experimentais.

Embora não tenhamos encontrado trabalhos prévios que avaliem os efeitos mutagênicos do artesunato (ou outras artemisininas) usando o teste do micronúcleo, nossos achados estão de acordo com Abou-Eisha e Afifi (2004), que também observaram um aumento na frequência de MN em cultura de linfócitos humanos expostos a outro importante antimalárico denominado pirimetamina sulfadoxina (Fansidar).

Efeitos genotóxicos do antimalárico pirimetamina também foram encontrados por Vijayalaxmi & Vishalakshi (2000) em outros modelos experimentais *in vivo*, como por exemplo, em medula óssea e células placentárias de camundongos, utilizando o

teste do micronúcleo. Eles observaram que esta droga em altas concentrações aumenta a frequência de MN nestas células.

Krishnaja & Chauhan (2000), semelhantemente observaram efeito genotóxico em seus trabalhos com o antimalárico dihidroclorato de quinacrina em cultura de linfócitos periféricos humanos, segundo os quais houve um aumento na frequência de aberrações cromossômicas (cromossomos dicêntricos, translocações e inversões) após o tratamento com a droga. Clarke *et al.* (2001), também encontraram efeitos genotóxicos no que diz respeito ao dihidroclorato de quinacrina, porém ao invés de linfócitos humanos, seus estudos foram realizados em eritrócitos de camundongos *in vivo*.

Diferentemente de nossos resultados, Alvarez *et al.* (2004) não encontraram efeito genotóxico em seu estudo com o antimalárico extraído da planta *Solanum nudum*, quando administrado intraperitonealmente em rato e analisado pelo teste do micronúcleo.

No presente estudo, não encontramos uma diminuição significativa no índice de divisão nuclear (IDN) das células. 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 artesunato já foram observadas por outros autores. Veerasubramanian *et al.* (2006) demonstraram que o artesunato em concentrações similares às utilizadas em nosso estudo apresentam a capacidade em reduzir a proliferação de linfócitos estimulados por fitohemaglutinina. Zhou e Feng (2005) observaram que o artesunato bloqueia o ciclo celular durante as fases G0/G1 em células musculares lisas da aorta de ratos. Em ambos os estudos, técnicas mais acuradas, tais como, citometria de fluxo e fluxometria foram utilizadas. Provavelmente, o IDN não é um parâmetro sensível para a detecção de efeitos citostáticos nas condições avaliadas.

Os resultados observados por meio dos testes do cometa e micronúcleo mostraram que o ARS é um agente com grande potencial genotóxico e mutagênico, em nossas condições experimentais. De forma geral, as células reagem de três formas distintas em resposta aos agentes genotóxicos: i) ativam mecanismos de controle da progressão do ciclo – os *checkpoints*, que interrompem ou retardam a progressão do ciclo; ii) removem o dano no DNA e restauram a continuidade desta molécula; iii) alternativamente ativam a apoptose (SANCAR *et al*, 2004). No que diz respeito ao processo apoptótico, os resultados do presente trabalho demonstraram que o artesunato induz um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0.05$ ) no número de células apoptóticas tanto em 24 quanto em 48 h de tratamento (Figura 15). Hou *et al.* (2009) também observaram que o composto SM934, um derivado hidrossolúvel da artemisinina, tem a capacidade de induzir apoptose em células T de ratos.

As artemisininas vêm ganhando destaque como potenciais drogas antineoplásicas. Por exemplo, um trabalho recente realizado por Li *et al.* (2009) mostrou que o artesunato exerce uma atividade anticancerígena *in vitro*. Tais autores demonstraram que esta droga tem a capacidade de bloquear o ciclo de células SP2/0 (mieloma de ratos) na fase  $G_0/G_1$  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 as artemisininas, é uma consequência da ativação de pontes endoperóxidas, condição esta que resulta na liberação de espécies reativas de oxigênio, as quais são as responsáveis pela ativação da via apoptótica

dependente de caspase. Desta forma, além de provavelmente serem responsáveis pelos efeitos genotóxicos, as espécies reativas de oxigênio poderiam também estar induzindo a morte celular observada nos linfócitos tratados com o artesunato.

Os resultados obtidos pelo presente estudo mostraram que o artesunato apresenta um claro efeito genotóxico e citotóxico. Uma das grandes preocupações que surge a partir dessa conclusão é a de que as modificações induzidas no DNA (efeito genotóxico/mutagênico) 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 poderia desencadear doenças imunes ou promover infecção crônica; disfunção imune poderia também influenciar no desenvolvimento e progressão do câncer (SHENKER *et al*, 2000; ARARAGI, 2003).

## 6 CONCLUSÃO

- ❖ O artesunato induz um aumento no índice de dano ao DNA de linfócitos humanos;
- ❖ O artesunato aumenta a frequência de MN em linfócitos humanos;
- ❖ O artesunato induz um aumento na taxa de PNP em linfócitos humanos;
- ❖ O artesunato não apresenta efeito no índice de divisão nuclear de linfócitos humanos;
- ❖ O artesunato induz apoptose e necrose em linfócitos humanos após 24 e 48 h de exposição.

## 7 PUBLICAÇÕES

Os dados obtidos no presente estudo foram recentemente publicados (2011) na revista *Environmental and Molecular Mutagenesis* "***In vitro Evaluation of the Genotoxic and Cytotoxic Effects of Artesunate, An Antimalarial Drug, in Human Lymphocytes***" (Anexo 1); e ainda aprovado e apresentado em 2 (dois) congressos nacionais: 56º Congresso Brasileiro de Genética, que ocorreu em São Paulo/Guarujá, no período de 14 à 17 de Setembro de 2010, no Casa Grande Hotel Resort, intitulado "**Avaliação *In Vitro* dos Efeitos Genotóxicos do Antimalárico Artesunato em Linfócitos Humanos**"; e no X Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, que ocorreu em São Pedro/São Paulo, no período de 5 à 8 de Junho de 2011, no Hotel Fazenda Fonte Colina Verde, intitulado "**Artesunate Induces Apoptosis in Human Lymphocytes as Evaluated by Annexin V Assay**".

## 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.

ALVAREZ, G.; PABÓN, A.; CARMONA, J. & BLAIR, S. Evaluation of Clastogenic Potential of the Antimalarial Plant *Solanum nudum*. **Phytother. Res.**, **18**: 845 - 848. 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.

ANDERSON, D.; YU, T. W.; PHILLIPS, B. J. & SCHMEZER, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. **Mutat. Res.**, **307**: 261-271. 1994.

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.

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.

BAUMGARTNER, A; SCHMID, T. E.; CEMELI, E.; ANDERSON, D. Parallel evaluation of doxorubicin-induced genetic damage in human lymphocytes and sperm using the comet assay and spectral karyotyping, **Mutagenesis**, **19**: 313 - 318. 2004.

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

BOARETO, A. C.; MULLER, J. C.; BUFALO, A. C.; BOTELHO, G. G. K.; ARAUJO, S. L.; FOGLIO, 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.

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.

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.

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. **Mutat. Res.**, **516**: 49 - 56. 2002.

CLARKE, J. J.; SOKAL, D. C.; CANCEL, A. M.; CAMPEN, D. B.; GUDI, R.; WAGNER, V. O.; SAN, R. H. C. & JACOBSON-KRAM, D. Re-evaluation of the mutagenic potential of quinacrine dihydrochloride dehydrate. **Mutat. Res.**, **494**: 41 - 53. 2001.

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

COOK, P. R. & BRAZELL, I. A. Detection and repair of single-strand breaks in nuclear DNA. **Nature**, **263 (5579)**: 679 – 82. 1976.

COOK, P. R.; BRAZELL, I. A.; PAWSEY, S. A. & GIANNELLI, F. Changes induced by ultraviolet light in the superhelical DNA of lymphocytes from subjects with xeroderma pigmentosum and normal controls. **J Cell Sci.**, **29**: 117 - 27. 1978.

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.; 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.

EFFERTH, 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.; MANNS, 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.

ENGELAND, M. V. NIELAND, L. J. W.; RAMAEKERS, F. C. S.; SCHUTTE, B. & REUTELINGSPERGER, C. P. M. Annexin V-Affinity Assay: A review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. **Cytometry** **31**: 1 - 9. 1998.

ERIKSSON, S.; NYGREN, J. & AHNSTRÖM, G. Matrix association of early- and late-replicating chromatin studied by single-cell electrophoresis. **Biochim Biophys Acta.**, **1590 (1 - 3)**: 103 - 8. 2002.

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. **Mutat. Res.**, **455**: 81 - 95. 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutat. Res.**, **600**: 58 - 66. 2006.

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.

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.

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, L. F.; HE, S.J.; WANG, J. X.; YANG, Y.; ZHU, F. H.; ZHOU, Y.; HE, P. L.; ZHANG, Y.; YANG, Y. F.; LI, Y.; TANG, W. & ZUO, J. P. SM934, a water-soluble derivative of artemisinin, exerts immunosuppressive functions in vitro and in vivo. **International Immunopharmacology**, **9(13-14)**: 1509 - 1517. 2009.

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.

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

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.

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.

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 $\kappa$ B p65. **Int J Hematol**, DOI 10.1007/s12185-009-0409-z. 2009.

LINDBERG, H. K.; FALCK, G. C.; JÄRVENTAUUS, 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. Quantification 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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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. **Mutat. Res.**, **514 (1 - 2)**: 19 - 27. 2002.

RAZIN, S. V; GROMOVA, I. I. & IAROVAIA, O. V. Specificity and Functional Significance of DNA Interaction with the Nuclear Matrix: new approaches to clarify the old questions. **Int Rev Cytol.**, **162 B**: 405 - 48. 1995.

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.

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.

SINGH, M. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R. & SCHNEIDER P. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA in Individual Cells. **Exp. Cell Res.**, **175**: 184-191. 1988.

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.

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. **Mutat. Res.**, **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.

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

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.

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*. **Mutat. Res.**, **679**: 18 - 23. 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.

## Brief Communication

### **In vitro Evaluation of the Genotoxic and Cytotoxic Effects of Artesunate, An Antimalarial Drug, in Human Lymphocytes**

Tatiane C. Mota,<sup>1</sup> Plínio C. S. Cardoso,<sup>1</sup> Lorena M. Gomes,<sup>1</sup>  
Priscilla C. M. Vieira,<sup>1</sup> Regianne M. S. Corrêa,<sup>1</sup> Priscila Di Paula B. Santana,<sup>2</sup>  
Moisés S. Miranda,<sup>2</sup> Rommel M. R. Burbano,<sup>1</sup> and Marcelo O. Bahia<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém - Pará - Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Fecundação in vitro, Instituto de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém - Pará - Brazil

---

Artesunate is one of the main antimalarial drugs used in several countries. It is a semisynthetic compound derived from artemisinin, a substance extracted from the Chinese plant, *Artemisia annua* L. Despite the widespread use of artesunate as an antimalarial drug, there is a lack of data regarding its genotoxic effects in human lymphocytes. Therefore, in this study, we used the comet assay and micronucleus test to evaluate the possible genotoxic effects of artesunate in cultured human lymphocytes. In addition,

cell death by necrosis and apoptosis was also assessed. Cells exposed to different concentrations of artesunate showed a significant concentration-dependent increase ( $P < 0.05$ ) in DNA damage index and micronuclei frequency. A significant increase in the frequency of apoptotic and necrotic cells was also observed. Our results showed that artesunate is a genotoxic and cytotoxic compound in cultured human lymphocytes. Environ. Mol. Mutagen. 00:000–000, 2011. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

---

**Key words:** artesunate; genotoxicity; apoptosis; micronucleus; comet assay

---

#### INTRODUCTION

DNA damage induced by mutagens can be repaired but extensive damage can lead to the formation of chromosomal aberrations, which may be stable (translocations, insertions, and/or small deletions that not lead to cell death). As a result gene mutations can accumulate after successive cell divisions, and these mutations can play a key role in the process of carcinogenesis [Little, 2000]. Therefore, it is important to assess the genotoxic effects of medicinal compounds.

Artemisinin, also known as qinghaosu (QHS), is a natural sesquiterpene lactone endoperoxide present in the Chinese plant, *Artemisia annua* L. [Li and Wu, 1998; Lindgardh et al., 2009]. Artemisinin was isolated more than 30 years ago by Chinese scientists searching for a cure for malaria. However, it had been used much earlier for the treatment of fevers and other diseases [Klayman, 1985; Li and Wu, 1998]. Sesquiterpenes have attracted great scientific interest because of their important biological activities, such as antifungal activity and cytotoxicity [He et al., 2010]. Artesunate is a semisynthetic 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.

Despite the extensive use of artesunate as an antimalarial drug, there are few studies that have evaluated the genotoxicity and mutagenicity of this drug. However, there is strong evidence for the genotoxic effects of sesquiterpene lactones. For example, Vasconcellos et al.

---

Grant sponsor: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico); Grant Number: 576151/2008-4; Grant sponsor: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

\*Correspondence to: Marcelo O. Bahia, Universidade Federal do Pará, Campus Universitário do Guamá, Rua Augusto Corrêa 01, CEP: 66075-110, Belém, Pará, Brazil. E-mail: mbahia@ufpa.br

Received 25 February 2011; provisionally accepted 20 April 2011; and in final form 26 April 2011

DOI 10.1002/em.20659

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

(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. This study evaluates the genotoxic, and cytotoxic effects of artesunate on mammalian DNA, by exposing human lymphocytes to this drug in vitro.

## MATERIALS AND METHODS

### Culturing Isolated Lymphocytes

Blood samples (20 mL) were obtained by venipuncture from three healthy 20- to 30-year-old nonsmokers, two women and one man, with no recent history of exposure to mutagens. The donors gave written informed consent to participate in the study. Blood lymphocyte isolation was carried out using the procedure described by Fenech (2000).  $1 \times 10^6$  cells/mL were seeded in 5 mL of RPMI 1640 medium (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) supplemented with 20% fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 4% phytohemagglutinin A (Gibco-Invitrogen, Carlsberg, CA), 0.05 mg/mL gentamicin sulfate (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), and 0.002 mg/mL amphotericin B. Cells were cultured at 37°C in an incubator containing 5% CO<sub>2</sub>.

### Culture Treatment

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

### Comet Assay (Alkaline Version)

After 20 hr in culture, lymphocytes were treated with different concentrations of artesunate and with doxorubicin at a final concentration of 0.02 µg/mL as positive control. An aliquot of 450 µL from each culture was taken after 3 hr of treatment to test for the alkaline version of the Comet assay as described by Singh et al. (1988). Briefly, 450 µL aliquot of the cell suspension from each experimental group was taken and centrifuged at 1,000 rpm for 5 min in a microcentrifuge (Eppendorf). The resulting pellet was homogenized with 300 µL of a low melting point agarose (0.8%), spread onto microscope slides precoated with a normal melting point agarose (1.5%) and covered with a coverslip. After 5 min at 4°C, the coverslip was removed and the slides were immersed in cold lysis solution (2.5M NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Tris, 10% DMSO, and 1% Triton-X, pH: 10) for 1 week. According to Tice et al. (2000) the lysis duration used by different investigators varies considerably. One week was chosen since such period was suitable to our laboratory routine. After lysis, the slides were placed in an electrophoresis chamber and covered with freshly made electrophoresis buffer (300 mM NaOH; 1 mM EDTA, pH > 13). The electrophoresis was run for 25 min (34 V and 300 mA). Afterward, the slides were neutralized by submersion in distilled water (4°C) for 5 min and fixed in 100% ethanol for 3 min. Staining of the slides was performed immediately before the analyses using ethidium bromide (20 µg/mL). Slides were prepared in duplicate, and 100 cells were screened per sample (50 cells from each slide) using a fluorescent microscope (Olympus BX41) at 40× magnification. The damage index (DI) was visually determined based on the size and intensity of the comet's tail. The following five categories (0–4) were used: Class 0 (no damage); Class 1 (little damage with a short tail length smaller than the diameter of the nucleus); Class 2 (medium damage with a tail length one or two times the diameter of the nucleus); Class 3

(significant damage with a tail length between two-and-a-half to three times the diameter of the nucleus); and Class 4 (significant damage with a long tail of damage more than three times the diameter of the nucleus). Categories were used according to Collins, (2004).

### Micronucleus Test

This test was carried out using the procedure described by Fenech (2000). After 20 hr in culture, lymphocytes were treated with different concentrations of artesunate for 52 hr. Cytochalasin B (Sigma Chemical Co., St. Louis) (3 µg/mL) was added to each culture 24 hr before harvest to obtain binucleated cells. Seventy-two hours after the beginning of incubation, cells were harvested, centrifuged (5 min at 800 rpm) and quickly treated with a hypotonic solution (KCl 0.075 M). Afterward, cells were washed once with 5 mL of a cold methanol:acetic acid (5:1) (v/v) fixative and washed again with 5 mL of a cold methanol:acetic acid solution (3:1) (v/v). The cell suspension was dropped onto slides and stained in a solution of 5% Giemsa dye (Sigma Chemical Co., St. Louis) in phosphate buffer (pH 6.8) for 5 min. Micronuclei (MN) were scored in 1,000 binucleated cells using the criteria described elsewhere [Fenech, 2000]. The analysis was performed using an optical microscope (BIOVAL L2000A) at 100× magnification. As a measure of cytotoxicity, the nuclear division index (NDI) was calculated using the following formula:  $NDI = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]/N$ , where M1–M4 represent the number of cells with 1–4 nuclei as assessed in 500 cells. The frequency of nucleoplasmic bridges (NPBs) in 1,000 binucleated cells was also evaluated. As a positive control, doxorubicin was used at a final concentration of 0.02 µg/mL.

### Analysis of Apoptosis by Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit

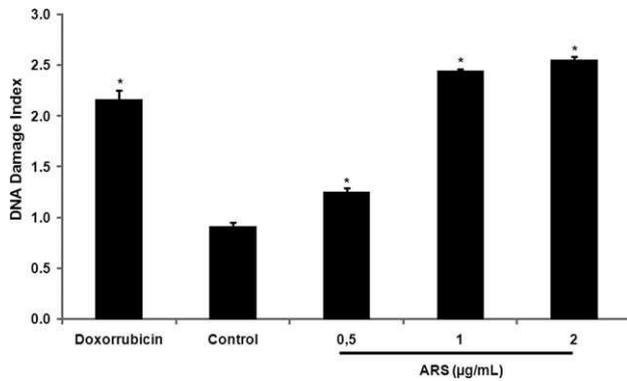
For these experiments the Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit (Calbiochem, Darmstadt, Germany) was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were treated with different concentrations of artesunate (0.5, 1, and 2 µg/mL) for 24 and 48 hr. After treatment, cells were centrifuged (2000 rpm/5 min) and resuspended in 200 µL of 1X coupling buffer. After recentrifugation, the supernatant was removed and the cells incubated in 50 µL of annexin V solution for 10 min at 4°C. After incubation, propidium iodide (2 µL) and Hoechst (2 µL) were added to the samples and cells were reincubated for 10 min at 4°C. Cell suspension was put on slides, covered with coverslips and observed on a fluorescence microscope Olympus BX41 with triple filter DAPI/FITC/TRITC. A total of 300 cells were analyzed in each slide according to the following criteria: cells stained in blue (Hoechst) were viable; cells stained in green (annexin) or in green and red (annexin and propidium iodide) were apoptotic cells and cells stained in red (propidium iodide) were necrotic cells.

### Statistical Analysis

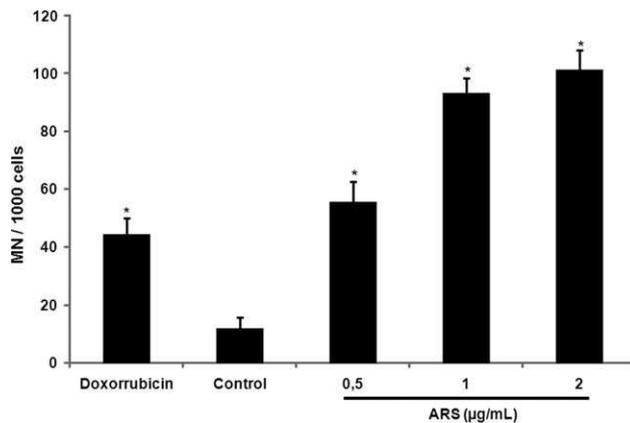
The results were subjected to analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test. The BIOSTAT 5.0 software [Ayres et al., 2007] was used to perform statistical analyses. In all tests, the significance level was 5%.

## RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the DNA damage index (DI) observed in human lymphocytes after 3 hr of treatment with different concentrations of artesunate. A concentration-dependent increase in DNA damage was observed. Moreover, the increase in the DI was statistically significant ( $P <$



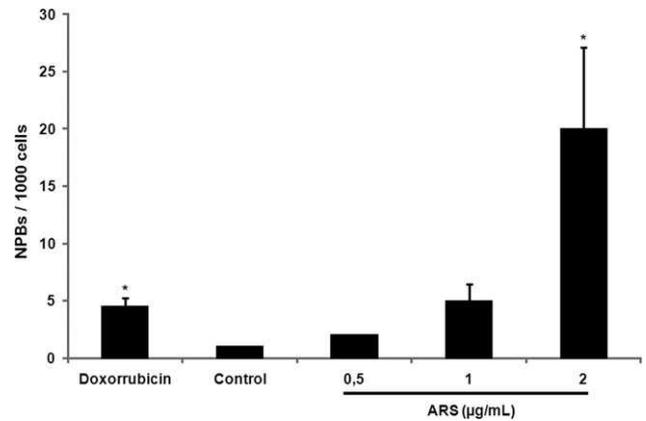
**Fig. 1.** Effect of artesunate (ARS) in cultured human lymphocytes analyzed by comet assay. \* $p < 0.05$  (ANOVA/Tukey post-test) when compared to negative control. Data are expressed as the mean values obtained from three donors;  $n = 3$ .



**Fig. 2.** Effect of artesunate (ARS) in cultured human lymphocytes assessed by micronucleus test. \* $p < 0.05$  (ANOVA/Tukey post-test) when compared to negative control. Data are expressed as the mean values obtained from three donors;  $n = 3$ .

0.05) for all evaluated concentrations when compared with the negative control. Reports on the genotoxicity of artesunate in mammalian cells are scarce. One of the few studies that address this topic is that of Li et al., (2008). These authors observed that, at high concentrations, artesunate causes oxidative damage to the DNA of Chinese hamster ovary cells (CHO-9), inducing single and double-strand breaks and apoptosis. Our results are in agreement with these findings [Li et al., 2008]. We observed a significant increase in the level of DNA damage in lymphocytes exposed to all concentrations of artesunate.

The micronuclei data showed similar results to those observed using the comet assay, with a significant increase ( $P < 0.05$ ) in the frequency of MN at all tested concentrations compared to the negative control. This increase was also dependent on the drug concentration (Fig. 2). Although we did not find any previous reports that evaluated the genotoxic effects of artesunate (or other artemisinins) using the micronucleus test, our findings are



**Fig. 3.** Effect of artesunate (ARS) in the induction of nucleoplasmic bridges (NPBs) in cultured human lymphocytes assessed by micronucleus test. \* $p < 0.05$  (ANOVA/Tukey post-test) when compared to negative control. Data are expressed as the mean values obtained from three donors;  $n = 3$ .

in agreement with authors that assessed the genotoxic effects of others sesquiterpenes [Burim et al., 2001; Canalle et al., 2001; Al-Zubairi et al., 2010].

Even though the ability of sesquiterpenes lactones to damage DNA is clear, there is no evidence of a direct interaction between such compounds and the DNA molecule. It is possible that DNA is not a target for the direct action of these drugs, since most studies have shown that lactones act mainly by inhibiting enzymes that play an important role in maintaining cellular integrity [Burim et al. 2001]. Therefore, the genotoxic effect observed in this study may be explained in another way. Artemisinins harbor an endoperoxide bridge that results in the generation of reactive oxygen species (ROS) and carbon-centered free radicals when cleaved [Li et al., 2008]. One possible explanation for the genotoxicity of artesunate may be an increase in ROS levels because such an increase can cause damage to DNA. In fact, the induction of oxidative damage mediated by artemisinins plays an important role in the antineoplastic effect demonstrated by these substances [Efferth et al., 2003; Efferth and Oesch, 2004].

In our study, we observed an increase in the induction of nucleoplasmic bridges (NPBs) in cells treated with artesunate. However, this increase was statistically significant ( $P < 0.05$ ) only at a concentration of 2 µg/mL when compared with the control (Fig. 3). NPBs between nuclei in binucleated (BN) cells provide a measure of chromosome rearrangement. The NPBs are presumed to occur when the centromeres of dicentric chromosomes are pulled to opposite poles of the cell during anaphase [Fenech, 2006]. Thus, our results indicate that artesunate induces complex changes in the chromosomes of treated cells. Our hypothesis is that single-strand breaks induced by artesunate (detected using the comet assay) do not undergo repair and are converted into double-strand

**TABLE I.** Effect of Artesunate (ARS) in the Nuclear Division Index (NDI) of Human Lymphocytes Analyzed by Micronucleus Test

Individuals	Nuclear Division Index (NDI)				
	Control	Dox (0.02 µg/ml)	ARS (µg/ml)		
			0.5	1	2
I 1	1.48	1.53	1.55	1.42	1.38
I 2	1.60	1.62	1.50	1.38	1.46
I 3	1.33	1.60	1.65	1.44	1.44
Mean	1.47	1.58	1.56	1.42	1.43
Standard deviation	± 0.14	± 0.05	± 0.08	± 0.03	± 0.04

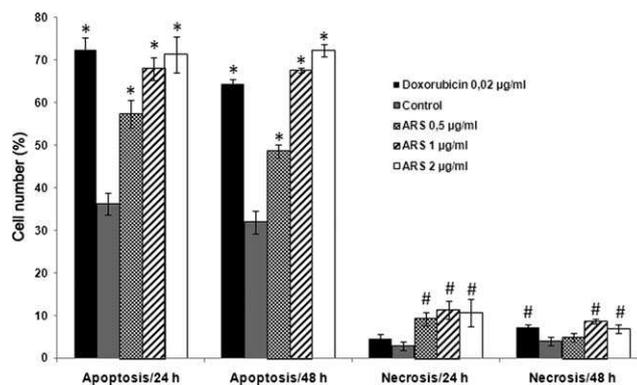
$P > 0.05$  (ANOVA).

breaks. This damage leads to structural chromosomal aberrations [Natarajan, 2002] and the formation of the observed NPBs. Li et al., (2008) showed that artesunate increases the levels of  $\gamma$ -H2AX foci in CHO-9 cells, albeit at higher concentrations than those used in this study.  $\gamma$ -H2AX is considered a marker for the formation of double-strand breaks in DNA.

In this study, we did not observe a significant decrease in the nuclear division index (NDI) (Table I). In other words, cytostatic effects induced by artesunate were not detected in our experimental conditions. However, if the controls are not considered, in each case there is a general reduction in NDI after the lowest concentration tested, which suggests that artesunate, in high concentrations, appear to inhibit cell cycle progression. Changes in cell cycle kinetics that are induced by artesunate have been observed by other authors. Veerasubramanian et al. (2006) reported that artesunate, in concentrations similar to those used in this study, had the ability to reduce the proliferation of lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin. Zhou and Feng (2005) reported that artesunate blocked the cell cycle during the G0/G1 phase in vascular smooth muscle cells from the aortas of mice. In both studies, more accurate techniques, such as flow cytometry and flowmetry, were used to detect changes in cell cycle kinetics. NDI may not be a sensitive parameter for detecting cytostatic effects in the evaluated conditions.

Cell viability results observed in this study showed that artesunate induces apoptotic and necrotic cells after 24 or 48 hr of treatment (Fig. 4). Chen et al. (2009) demonstrated that dihydroartemisinin, a major metabolite of artesunate, inhibits proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer in mice, both in vivo and in vitro, which is in accordance with our results. According to Nam et al. (2007), the ability of artemisinin and its derivatives to induce apoptosis is a major feature that highlights such drugs as potential chemotherapeutic agents.

As said by Mercer et al. (2007), cell death induced by endoperoxides, such as artemisinins is a consequence of activation of endoperoxide moiety, a condition that results



**Fig. 4.** Frequency of apoptosis and necrosis induced by artesunate (ARS) in cultured human lymphocytes evaluated by annexin V assay after 24 and 48 h exposure. \*# $p < 0.05$  (ANOVA/Tukey post-test) related to control. Data are expressed as the mean values obtained from three donors;  $n = 3$ .

in release of ROS, which are responsible for the activation of caspase dependent apoptotic pathway. Thus, besides probably being responsible for the genotoxic effects observed, the ROS may possibly induce the cell death observed in lymphocytes treated with artesunate.

Our data shows that artesunate is a potent genotoxic and cytotoxic compound in human lymphocytes. A major concern that arises from this conclusion is that the changes induced in the DNA of individuals using artesunate as an antimalarial drug may result in an increased risk of carcinogenesis.

## REFERENCES

- Al-zubairi AS, Abdul AB, Syam MM. 2010. Evaluation of the genotoxicity of zerumbone in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Toxicology in Vitro* 24:707–712.
- Arreesrisom P, Dondorp AM, Looareesuwan S, Udomsangpetch R. 2007. Suppressive effects of the anti-oxidant N-acetylcysteine on the anti-malarial activity of artesunate. *Parasitol Int* 56:221–226.
- Ayres M, Ayres MJ, Ayres DM, Dos Santos AS. 2007. *Bioestat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. 5th edition. Belém, Pará.
- Burim RV, Canalle R, Lopes JLC, Vichnewski W, Takahashi CS. 2001. Genotoxic action of the Sesquiterpene lactone centratherin on mammalian cells in vitro and in vivo. *Teratog Carcinog Mutagen* 21:383–393.
- Canalle R, Burim RV, Callegari Lopes JL, Takahashi CS. 2001. Assessment of the cytotoxic and clastogenic activities of the sesquiterpene lactone lynchnopholide in mammalian cells in vitro and in vivo. *Cancer Detect Prev* 25:93–101.
- Chen H, Sun B, Pan SH, Li J, Xue DB, Meng QH, Jiang HC. 2009. Study on anticancer effect of dihydroartemisinin on pancreatic cancer. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 47:1002–1005.
- Collins AR. 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26:249–261.
- Efferth T, Briehl MM, Tome ME. 2003. Role of antioxidant genes for the activity of artesunate against tumor cells. *Int J Oncol* 23: 1231–1235.
- Efferth T, Oesch F. 2004. Oxidative stress response of tumor cells: microarray-based comparison between artemisinins and anthracyclines. *Biochem Pharmacol* 68:3–10.

- Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 455:81–95.
- Fenech M. 2006. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res* 600:58–66.
- He X-F, Yin S, Ji Y-C, Su Z-S, Geng M-Y, Yue J-M. 2010. Sesquiterpenes and dimeric sesquiterpenoids from *Sarcandra glabra*. *J Nat Prod* 73:45–50.
- Hien TT, Phu NH, Mai NT, Chau TT, Trang TT, loc PP, Cuong BM, Dung NT, Vinh 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.
- 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* 2:1–7.
- Klayman DL. 1985. Qinghaosu (artemisinin): An antimalarial drug from China. *Science* 228:1049–1055.
- 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* 68:4347–4351.
- Li Y, Wu YL. 1998. How Chinese scientists discovered qinghaosu (artemisinin) and developed its derivatives? What are the future perspectives? *Med Trop* 58:9–12.
- Lindegardh N, Tarning J, Toi PV, Hien TT, Farrar J, Singhasivanon P, White NJ, Ashton M, Day NPJ. 2009. Quantification of artemisinin in human plasma using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Pharma Biomed Anal* 49:768–773.
- Little JB. 2000. Ionizing Radiation. In: Bast Jr RC, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei E, editors. *Cancer Medicine*. B.C. Decker Inc. 2400 p.
- 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. *J Biol Chem* 282:9372–9382.
- Nam W, Tak J, Ryu J-K, Jung M, Yook J-I, Kim H-J, Cha I-H. 2007. Effects of artemisinin and its derivatives on growth inhibition and apoptosis of oral cancer cells. *Wiley Periodicals* 29:335–340.
- Natarajan AT. 2002. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutat Res* 504:3–16.
- 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* 514:19–27.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low DNA levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184–191.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206–221.
- 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* 631:16–25.
- 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* 37:838–847.
- Zhou Z, Feng Y. 2005. Artesunate reduces proliferation, interferes DNA replication and cell cycle and enhances apoptosis in vascular smooth muscle cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 25:135–136.

Accepted by—  
B. Parsons