



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

REGIANNE MACIEL DOS SANTOS CORREA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS POSSÍVEIS EFEITOS
CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS DO ALCALÓIDE
JULOCROTINA EM LINFÓCITOS HUMANOS**

BELÉM-PA
NOVEMBRO – 2011

REGIANNE MACIEL DOS SANTOS CORREA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS POSSÍVEIS EFEITOS
CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS DO ALCALÓIDE
JULOCROTINA 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-PA
NOVEMBRO – 2011

REGIANNE MACIEL DOS SANTOS CORREA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS POSSÍVEIS EFEITOS
CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS DO ALCALÓIDE
JULOCROTINA EM LINFÓCITOS HUMANOS**

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia.
Professor da Universidade Federal do Pará (UFPA)
Orientador

Prof. Dr. André Salim Khayat.
Professor da Universidade Federal do Pará (UFPA)
Membro

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

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

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

INSTITUIÇÕES

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



FONTES FINANCIADORAS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

– Bolsa de mestrado.



Dedico este trabalho ao meu Pai Eterno, Deus;
Aos meus pais Rosa e Reginaldo por me amarem e educarem;
Ao meu filho Anthony Felipe, herança de Deus, mesmo sem
compreender a importância deste trabalho, és a razão de meu viver;
Meus irmãos Renan e Reginaldo, pelos momentos que me deram de
muita alegria;
E ao meu marido e “filhão” Ivan, que sempre me encorajou, e
acreditou em mim por sempre estar ao meu lado em todos os
momentos e sempre me dando apoio.

Ao prof. Marcelo de Oliveira Bahia com carinho, respeito e admiração, pelas oportunidades oferecidas, amizade, paciência e principalmente pelos conhecimentos adquiridos, sobretudo quanto aos atos de humanidade e compreensão.

Meu eterno agradecimento.

AGRADECIMENTOS

Ao **Senhor Deus**, por ter me honrado;

Aos meus pais, por me incentivarem nos estudos. Creio que seus sonhos estejam se realizando;

Aos meus parentes, principalmente minha tia Ana, por ser amorosa e por ter me acolhido em sua casa;

Ao meu eterno namorado “filhão”;

Ao meu filho, minha vida, meu respirar;

As minhas avós “**Biseca**” (in memoriam) e **Dulcineia**;

A minha cunhada **Ivani** pelo seu carinho no desalento e minha companheira;

Aos meus amigos, **Tatiane, Lorena, Plínio e Diego**, por compartilharem seus conhecimentos. Sou infinitamente grata por tudo que fizeram por mim, pela ajuda e dedicação para a realização deste trabalho. Este trabalho é nosso. Eu amo vocês.

Minha amiga **Marcela**, por ter cruzado em minha vida e por nunca não ter esquecido de nossa amizade.

Aos **meus colegas** do Laboratório de Citogenética Humana (LCH);

A técnica do Laboratório de Citogenética, **Glorinha**;

Ao meu orientador **Marcelo de Oliveira Bahia**, sempre disposto a me ajudar com sua paciência e dedicação e que me ensinou a descobrir o caminho do conhecimento, por ter dado uma pequena porção de seu grandioso talento e virtude que tenho como herança e assim me fez crescer em conhecimento. Obrigada, por ter acreditado em mim, valeu!

Aos professores do Laboratório de Citogenética, **Adriana Guimarães, André Khayat, Carlos Rocha e Raquel Montenegro** e em especial ao professor **Rommel Burbano**, por abrir a porta de um mundo novo, a ciência, o conhecimento e ter me dado à oportunidade de explorá-lo. Muito obrigada!

A Universidade Federal do Pará (UFPA), ao Instituto de Ciências Biológicas, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e em especial, ao Laboratório de Citogenética Humana (LCH) da UFPA.

O Senhor Deus apareceu num sonho a Salomão e perguntou: o que é que eu lhe dê? Ele respondeu: “Ó Senhor Deus, tu deixaste que eu ficasse como rei no lugar de meu pai, embora eu seja muito jovem e não saiba governar. Portanto, dá-me sabedoria para que eu possa governar o teu povo com justiça e saber a diferença entre o bem e o mal”. Deus gostou de Salomão ter pedido isso e disse: “Já que você pediu sabedoria para governar com justiça, em vez de pedir vida longa ou riquezas, ou a morte de seus inimigos, eu darei o que você pediu, darei a você sabedoria e inteligência, como ninguém teve antes de você, nem terá depois. Mas lhe darei também o que não pediu: durante toda a sua vida, você terá riquezas e honras, mas do que qualquer outro rei”.

RESUMO

A leishmaniose é considerada um problema de saúde pública, principalmente devido à presença de diferentes espécies enzoóticas de *Leishmania*, envolvendo muitos hospedeiros e diferentes insetos vetores. Os antimonialis pentavalentes permanecem como as drogas de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses há mais de 50 anos, no entanto, sua utilização vem sendo comprometida devido, principalmente, a resistência desenvolvida pelo parasita ao medicamento. Assim, a escolha de drogas derivadas de plantas baseada no estudo e utilização de práticas da medicina tradicional devem aparecer como nova estratégia para o controle da leishmaniose. No entanto, é importante verificar que algumas destas drogas podem ser tóxicas ao organismo, podendo inclusive apresentar propriedades genotóxicas, causando alterações no DNA com conseqüente aumento no risco de carcinogênese. A Julocrotina (2-[N-(2-methylbutanolyl)]-N-phenylethylglutarimide) é um alcalóide glutarimida isolado da espécie *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae), encontrada amplamente na Floresta Amazônica e conhecido por possuir potente efeito leishmanicida. Desta forma, no presente estudo avaliamos o efeito citotóxico e genotóxico da Julocrotinaa partir do Ensaio do MTT e Ensaio do Cometa (versão alcalina) em cultura de linfócitos humanos. Como resultado, o alcalóide não demonstrou citotoxicidade em linfócitos humanos nas concentrações testadas. No entanto, a julocrotina mostrou-se genotóxica para linfócitos humanos tratados com a maior concentração (632 μ M) da substância. Apesar dos resultados de citotoxicidade parecem promissores no que diz respeito ao uso da julocrotina no tratamento da leishmaniose, o efeito genotóxico observado reforça a necessidade de se obter as devidas precauções quanto ao seu uso como fitoterápico leishmanicida.

Palavras - chave: *Croton pullei*, julocrotina, genotoxicidade, ensaio do cometa, teste do MTT.

ABSTRACT

Leishmaniasis is considered a public health problem, mainly due to the presence of different species of enzootic *Leishmania*, involving many different hosts and insect vectors. The pentavalent antimony remain the first choice drugs for the treatment of leishmaniasis for more than 50 years, however, its use has been compromised due mainly to the parasite developed resistance to the drug. Thus, the choice of drugs derived from plants based on the study and use of traditional medicine practices should appear as a new strategy for the control of leishmaniasis. However, it is important to note that some of these drugs can be toxic to the body and may even have genotoxic properties, causing changes in DNA with consequent increased risk of carcinogenesis. Julocrotine (2-[N-(2-methylbutanoly)]-N-phenylethylglutarimide) is an alkaloid isolated from the species *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae), widely found in the Amazon jungle and known to possess potent leishmanicidal effect. Thus, the present study evaluated the cytotoxic and genotoxic effects of julocrotina using the MTT and the Comet Assays in cultured human lymphocytes. Our results showed that the alkaloid did not show cytotoxicity in human lymphocytes at the concentrations tested. However, julocrotine showed to be genotoxic to human lymphocytes treated with the highest concentration (632 μ M) of the substance. Although the cytotoxicity results seem promising with respect to the use of julocrotina in the treatment of leishmaniasis, the genotoxic effect observed reinforces the need to obtain the necessary cautions for its use as an herbal leishmanicidal.

Keywords: *Croton pullei*, julocrotine, genotoxicity, comet assay, MTT assay.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1	Estrutura química da julocrotina isolada de <i>C. pullei</i>	4
FIGURA 2	Figura da espécie <i>Croton pullei</i> var. <i>glabrior</i> Lanj.....	5
FIGURA 3	Desenho esquemático mostrando a produção de células sanguíneas com destaque para os linfócitos.....	7
FIGURA 4	Micrografia do padrão de escores utilizados para determinação do índice de dano dos linfócitos humanos obtidos do ensaio do cometa.....	14
FIGURA 5	Valores de viabilidade celular observados em culturas de linfócitos humanos analisados pelo teste do MTT.....	16
FIGURA 6	Valores dos índices de danos para cada indivíduo e para cada concentração de julocrotina em cultura de linfócitos humanos analisado pelo ensaio do cometa.....	17
FIGURA 7	Valores do índice de dano ao DNA (ID) observado em linfócitos humanos.....	18

LISTA DE SIGLAS

- AC – Aberrações Cromossômicas.
- Desv. Pad – Desvio padrão.
- DMSO–Dimetilsufóxido.
- EDTA– Ácido Etilenodiamino tetra-acético.
- FBS – Fetal Bovine Serum (Soro Bovino Fetal).
- FISH – Hibridação Fluorescente *In Situ*.
- FUNASA – Fundação Nacional da Saúde.
- ID – Índice de dano.
- LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana.
- LV – Leishmaniose Visceral.
- MS – Ministério da Saúde.
- μM – micromolar
- MTT–Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio.
- NMU – Nitrosometilurea.
- NaCl – Cloreto de sódio.
- NaOH– Hidróxido de sódio.
- ON – Óxido Nítrico.
- OMS – Organização Mundial da Saúde.
- ROS – Espécies reativas de oxigênio.
- RPM – Rotação por minuto.
- SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação.
- WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Leishmaniose.....	1
1.2 Utilização de produtos naturais para fins terapêuticos.....	2
1.3 Julocrotina.....	3
1.4 Genotoxicidade dos alcalóides.....	6
1.5 Cultura de linfócito humanos como modelo de estudo.....	7
2. OBJETIVOS.....	9
2.1 Objetivo Geral.....	9
2.2 Objetivos Específicos.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Extração e isolamento da julocrotina.....	10
3.2 Coleta do sangue.....	10
3.3 Isolamento de linfócitos com <i>Ficoll Paque</i> ®.....	10
3.4 Separação de linfócitos por decantação.....	11
3.5 Teste de viabilidade celular (MTT).....	11
3.6 Ensaio do Cometa (versão alcalina).....	12
3.6.1 Princípio da técnica.....	12
3.6.2 Preparação das lâminas.....	13
3.6.3 Eletroforese.....	13
3.6.4 Coloração.....	14
3.6.5 Análise das lâminas.....	14
3.7 Análise Estatística.....	15
4.RESULTADOS.....	16
4.1 Teste de Viabilidade Celular (MTT).....	16
4.2 Ensaio do Cometa (versão alcalina).....	17
5.DISCUSSÃO.....	19
6.CONCLUSÃO.....	23
7.REFERÊNCIAS.....	24

1. INTRODUÇÃO

1.1. LEISHMANIOSE

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidas por meio de vetores flebotomíneos infectados. Essas doenças possuem um espectro grande de manifestações clínicas, sendo estas diferenças relacionadas à espécie de *Leishmania* envolvida (WHO, 2011). As leishmanioses são zoonoses consideradas, inicialmente, de transmissão essencialmente silvestre, estando limitadas a áreas rurais e a pequenas localidades urbanas. No entanto, tal padrão de transmissão vem apresentando mudanças em decorrência das modificações socioambientais, como o desmatamento e o processo migratório caracterizado pelo êxodo rural, levando o homem para as periferias das grandes cidades (Ministério da Saúde, 2011).

As leishmanioses são consideradas pela Organização Mundial de Saúde como uma das seis mais importantes doenças parasitárias, afetando as populações de 88 países (66 do Velho Mundo e 22 do Novo Mundo) de quatro continentes (Ásia, África, Europa e América). Estima-se uma prevalência global de 12 milhões de pessoas infectadas e de aproximadamente 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco (WHO, 2011). Na Região Amazônica, a leishmaniose é um problema de saúde pública, principalmente devido à presença de diferentes espécies enzoóticas de *Leishmania*, envolvendo muitos hospedeiros e diferentes insetos vetores (Lainson; Shaw, 2005).

Mais de 15 espécies de *Leishmania* são conhecidas por causar duas manifestações clínicas da leishmaniose, que são a leishmaniose tegumentar e a leishmaniose visceral (Croft *et al.*, 2006). No Brasil, a média de casos de Leishmaniose Visceral (LV) no período de 2005 a 2009, foi de 3.679 casos/ano, com uma taxa de letalidade de 5,8% em 2009. A LV é uma doença crônica e sistêmica e que quando não tratada, pode evoluir para o óbito em mais de 90% dos casos. Quanto a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), no período de 2000 a 2009, foi registrada no Brasil uma média de 24.684 casos confirmados de LTA no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) (Pelissari *et al.*, 2011).

O tratamento é feito com o objetivo de obter a cura clínica dos doentes, no entanto, devido ao parasito ser intracelular este objetivo é difícil de ser alcançado. Diante disso, se busca uma “cura” parasitológica e clínica inicial e manutenção do tratamento por tempo suficiente para prevenir recidiva (FUNASA, 2000).

1.2. UTILIZAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS PARA FINS TERAPÊUTICOS

Há muitos anos o homem vem utilizando os recursos da flora no tratamento de diversas patologias. Foi através da observação e da experimentação pelos povos primitivos que as propriedades terapêuticas de determinadas plantas foram sendo descobertas e propagadas de geração em geração, fazendo parte da cultura popular (Turolla; Nascimento, 2006). De acordo com Balunas e Kinghorn (2005) 25% das drogas prescritas no mundo são de origem vegetal. Entre 2001 e 2002 quase um quarto dos fármacos mais vendidos no mundo eram obtidos diretamente ou derivados de fontes naturais.

Os produtos naturais se constituem na principal fonte de produtos bioativos exercendo importante papel na medicina popular e também na medicina moderna. A falta de acesso à medicina tradicional e aos medicamentos industrializados leva grande parte da população mundial a utilizar compostos de origem natural, seja para prevenção ou para o tratamento de enfermidades (Akerlele, 1993). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2000), 80% da população dos países em desenvolvimento utiliza-se de práticas tradicionais na atenção primária, e desse total, 85% usa plantas medicinais ou preparações destas. Ainda segundo a OMS as práticas da medicina tradicional expandiram globalmente na última década e ganharam popularidade.

Sabe-se que 61% das 877 moléculas introduzidas na terapêutica entre os anos de 1981 a 2002 foram inspiradas em produtos naturais, sendo que 6% delas são empregadas diretamente como a substância original, 27% foram derivados de produtos naturais, 5% são compostos sintéticos com farmacóforos derivados de produtos naturais e 23% são sintéticos obtidos do desenho estrutural originado de um produto natural. Esses dados mostram que os produtos naturais têm grande valor intrínseco decorrente da sua atividade biológica, o que vem estimulando as companhias farmacêuticas (Cragg; Newman, 2003; Oliveira; Braga, 2003).

Exemplos claros da importância dos produtos naturais na terapêutica médica podem ser encontrados nos Estados Unidos da América, onde está localizada a grande maioria das indústrias químico-farmacêuticas do mundo, detendo, com isso uma grande parcela do mercado mundial farmacêutico. Essas indústrias, além da síntese, vêm também trabalhando no isolamento de produtos naturais que possam servir como futuros agentes terapêuticos (Borris, 1996; Patwardhan, 2005).

O Brasil é detentor de uma abundante flora e fauna com sua peculiar diversidade para o fornecimento de produtos naturais que são utilizados como remédios na profilaxia,

tratamento e cura de diferentes tipos de patologias. Dentre tais patologias podemos citar: as micoses, a malária, o diabetes, os altos níveis de colesterol e determinados tipos de cânceres (Matos; Matos, 1989; Van Den Berg, 1993; Farias *et al.*, 1997; Pinto *et al.*, 2002; Moraes *et al.*, 2003). O uso de tais produtos no tratamento de variadas patologias baseia-se em estudos etnobotânicos, a partir do uso repetitivo e tradicional. Através destes estudos foi possível reconhecer que os vegetais possuem classes de agentes fitoquímicos com diversas ações terapêuticas, como efeitos antioxidantes, antimutagênicos e até anticarcinogênicos (Kusamran *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 1998).

No entanto, Vicentini *et al.* (2001) relataram que os chás e infusões de plantas medicinais também podem conter substâncias tóxicas com efeitos mutagênicos. Por esta razão, não é correto afirmar que as plantas são benéficas ao organismo humano somente por serem plantas, pois elas podem apresentar substâncias farmacologicamente ativas que podem afetar o organismo dos que fazem uso delas. Assim, substâncias que em princípio podem ser consideradas como terapêuticas também podem causar efeitos indesejados ou tóxicos (Teixeira *et al.*, 2003; Pinho *et al.*, 2010).

Apesar do exposto, muitos produtos naturais ainda não foram cientificamente estudados para avaliar suas qualidades, segurança e eficácia (Simões *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2003; Calixto, 2005; Soares *et al.*, 2006). Exemplo disto ocorre no Brasil, onde a população habitualmente utiliza chás e infusões para o tratamento de doenças, sem que haja evidências científicas que comprovem a eficácia desses tratamentos. Portanto, o consumo destes produtos deve ser monitorado (Holetz *et al.*, 2002; Funari; Ferro, 2005).

1.3. JULOCROTINA

Como já descrito anteriormente, nos países em desenvolvimento, a medicina tradicional é usada para tratar a maioria das doenças, incluindo a leishmaniose. Neste contexto, o enorme potencial farmacêutico da Região Amazônica tem atraído atenção internacional tanto da comunidade em geral quanto da científica (Guimarães *et al.*, 2010).

Dentre as inúmeras substâncias naturais com potencial terapêutico encontradas na Amazônia temos a julocrotina. A Julocrotina (2-[N-(2-methylbutanoly)]-N-phenylethylglutarimide) (Figura 1), é um alcalóide glutarimida isolado da espécie *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae) (Figura 2), encontrada amplamente na Floresta Amazônica (Secco, 1992; Gallenmüller *et al.*, 2001; Barbosa *et al.*, 2007). Diversas plantas

do gênero *Croton* têm demonstrado possuir efeitos antiinflamatórios, propriedades antitumorais e efeito leishmanicida. Rocha *et al.* (2008) ao tratarem camundongos com extrato metanólico das folhas de *C. pullei*, verificaram que tal extrato reduzia de forma dose-dependente, o número de contorções abdominais em camundongos, sugerindo uma atividade antinociceptiva da planta, além disto, o extrato inibiu o edema de orelha induzido pelo óleo de croton e reduziu a migração leucocitária no teste da peritonite induzida por carragenina, indicando uma atividade antiinflamatória. De acordo com estes resultados, pode-se justificar o bom uso medicinal de *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae), contra patógenos que causam dor e inflamação. Propriedades antitumorais do extrato da raiz de *Croton membranaceus* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) também já foram relatadas em neoplasias de próstata (Mshana *et al.*, 2000).

O efeito principal da julocrotina parece ser o leishmanicida. Guimarães *et al.* (2010) em testes *in vitro* com macrófagos de camundongo infectados com amastigotas tratados com a julocrotina, observaram que a substância reduziu em 80% estes parasitas. Os autores também observaram alterações nas membranas dos promastigotas de *L.(L.) amazomensis* tratados com a julocrotina, incluindo a membrana plasmática, complexo de Golgi, membrana flagelar e alterações na organização da cromatina nuclear. Estes resultados sugerem que a julocrotina é citotóxica para os parasitas intracelulares, aumentando a efetividade da resposta microbicida dos macrófagos produzindo óxido nítrico (NO) e metabólitos reativos de oxigênio.

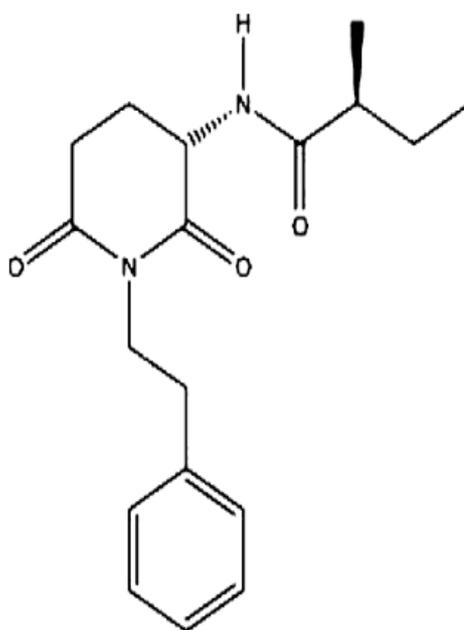


Figura 1- Estrutura química da julocrotina (Guimarães *et al.*, 2010).

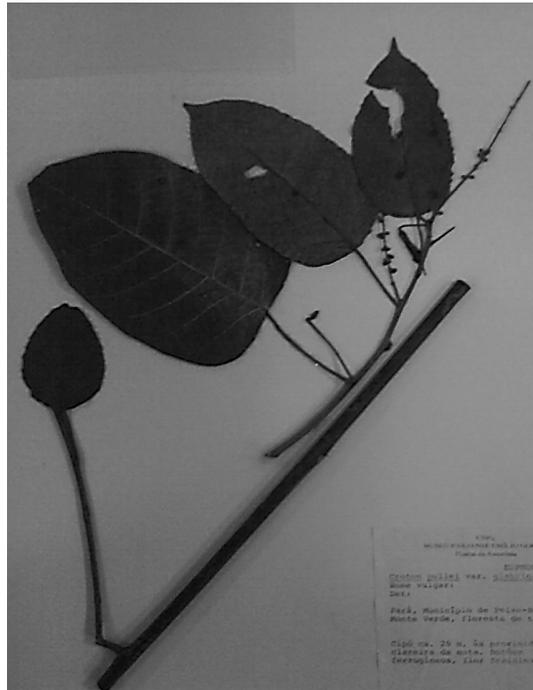


Figura 2: *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Acervo pessoal).

Outros alcalóides são citados por possuírem potente atividade antileishmania. Delorenzi *et al.* (2001) demonstrou que o alcalóide coronadine inibiu 100% o crescimento de promastigotas em apenas 6 dias e diminuiu a sobrevivência dos amastigotas de *L. amazonensis*. Em outro estudo, Rocha *et al.* (2009) avaliaram a ação leishmanicida dos alcalóides totais da *Crotalaria retusa* e observaram uma potente ação destes alcalóides contra células de *Leishmania chagasi*.

Apesar de existirem vários produtos naturais usados para conter a ação das leishmanioses, é válido ressaltar que os usos de tais produtos ainda não são efetivos para erradicar nenhuma forma da doença. Os antimoniais pentavalentes são as drogas de primeira escolha entre as usadas para o tratamento das leishmanioses, interferindo na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*. No entanto, tais drogas apresentam toxicidade cardíaca e renal (Ministério da Saúde, 2003). Assim, a intensificação de estudos e utilização de drogas derivadas de plantas na medicina tradicional tem sido uma estratégia importante para o controle da leishmaniose (Mendonça-Filho *et al.*, 2004).

1.4. GENOTOXICIDADE DE ALCALÓIDES

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, conferindo grande risco para o desenvolvimento de doenças como neoplasias (Natarajan, 1993).

Os danos no DNA induzidos por diversos agentes mutagênicos químicos, físicos ou biológicos, podem ser reparados ou processados, mas muitos deles podem levar à formação de aberrações cromossômicas (AC). As AC induzidas podem ser estáveis ou não, onde as primeiras referem-se a pequenos danos, translocações recíprocas e algumas aneuploidias, que não impedem a divisão e proliferação celular, enquanto que as não-estáveis, como os cromossomos dicêntricos e em anel, grandes deleções e fragmentos, normalmente são letais à célula. Diferentes alterações podem se acumular nas sucessivas divisões celulares e produzir mutações em genes, os quais teriam um papel fundamental no processo de carcinogênese (Little, 2000).

Os agentes químicos e físicos capazes de induzir a formação de AC são chamados de agentes clastogênicos, podendo ter seu potencial detectado por vários testes de mutagenicidade tais como a análise de aberrações cromossômicas em células metafásicas, o teste do micronúcleo, o teste do cometa, entre outros (Al-Sabati *et al.*, 1992; Guimarães *et al.*, 2003; Movajagh *et al.*, 2005).

Neste contexto, faz-se necessário o estudo genotóxico de substâncias com potencial uso terapêutico e que não apresentam relatos a respeito de sua ação no DNA, como a julocrotina, sobretudo pelo fato de já existirem evidências da atividade genotóxica dos alcalóides. Por exemplo, um estudo realizado por Cong *et al.* (2007) mostrou que alcalóides isolados da raiz e do rizoma de *Veratrum japonicum* (Baker) apresentaram um claro efeito genotóxico em células cerebrais de camundongos através do ensaio cometa.

Em outro estudo, Boeira *et al.* (2001) avaliaram *in vitro* os efeitos genotóxicos dos alcalóides harman e harmina (presentes em plantas amplamente usadas em práticas médicas) utilizando células V79 (fibroblastos de pulmão de hamster). Tais autores verificaram que os alcalóides aumentaram a frequência de células com aberrações cromossômicas e induziram dano no DNA avaliado pelo ensaio Cometa, provavelmente como consequência de sua habilidade de induzir quebras na fita do DNA.

Finalmente, Santos-Mello *et al.* (2002) mostraram que alcalóides extraídos de *Senecio brasiliensis* (Sprengel) ainda apresentavam a capacidade de induzir micronúcleos em eritrócitos policromáticos de medula óssea de ratos, mesmo depois de serem estocados por mais de 23 anos sob diferentes condições ambientais.

1.5. CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS COMO MODELO DE ESTUDO

Os linfócitos são células responsáveis pela extraordinária especificidade das respostas imune adaptativas de nosso organismo. Como pode ser visto na figura 3, 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).

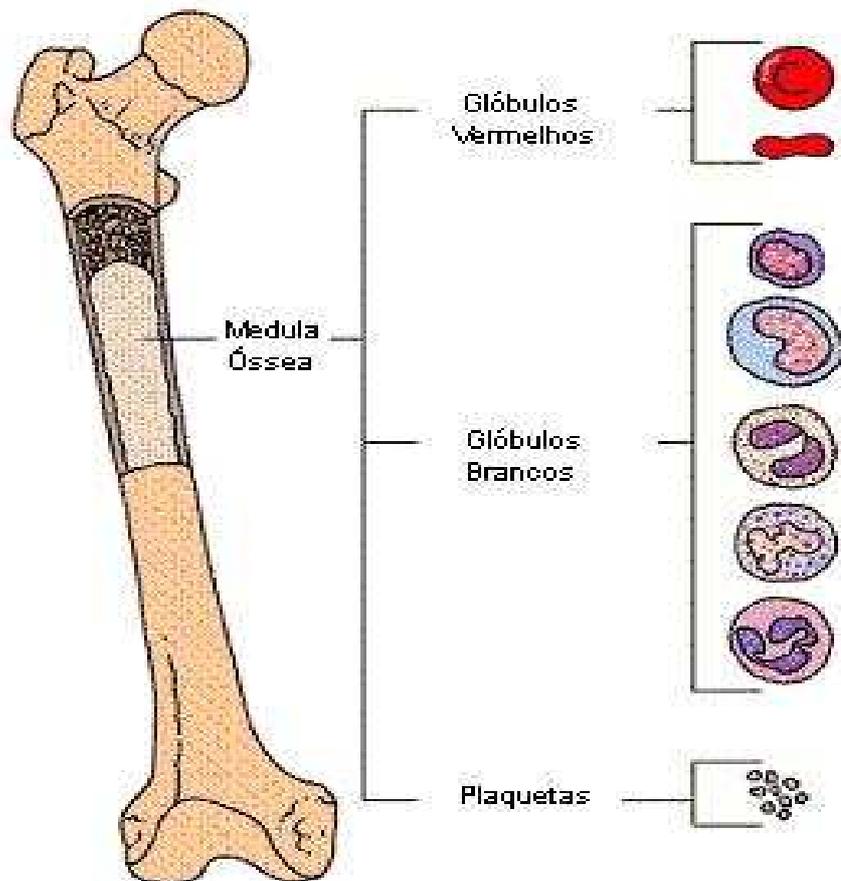


Figura 3: Os tipos celulares que a medula óssea é capaz de formar (<http://images.google.com.br>).

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, o presente estudo objetiva gerar informações a respeito do efeito da julocrotina no DNA de linfócitos humanos, uma vez que esta substância já demonstra um claro efeito antileishmanicida, podendo no futuro ser utilizada efetivamente no tratamento da leishmaniose. A importância desta análise reside no fato de que danos genotóxicos gerados por medicamentos podem aumentar o risco de carcinogênese em pacientes submetidos ao tratamento com os mesmos. A expectativa é de que os resultados produzidos nesta dissertação colaborem no sentido de auxiliar na implementação de estratégias de tratamento que sejam seguras e eficazes no controle da leishmaniose, mas que levem em consideração os efeitos adversos que tais tratamentos possam exercer no DNA.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho objetivou avaliar *in vitro* os possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos de diferentes concentrações do alcalóide glutarimida julocrotina isolado da espécie *C. pullei* em cultura de células linfocitárias humanas procedentes de sangue periférico humano.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar a citotoxicidade de diferentes concentrações de julocrotina em cultura de linfócitos humanos através do ensaio do MTT;
- b) Avaliar o índice de dano ao DNA demonstrado pelas células após o tratamento com diferentes concentrações da julocrotina utilizando o ensaio do cometa.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Extração e Isolamento da Julocrotina

A julocrotina foi gentilmente cedida pela Prof^a. Giselle Guilhon do Departamento de Química da Universidade Federal do Pará. A extração e o isolamento da substância foram realizados de acordo com Barbosa *et al.* (2007).

3.2. Coleta do sangue

Sangue periférico foi coletado de 3 (três) indivíduos hígidos, sendo duas mulheres e um homem com idade entre 28 e 30 anos, 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 seringa descartável de 20 mL, devidamente heparinizada (Liquemine – Laboratório Roche, 5000 U/mL) para evitar a coagulação.

3.3. Isolamento de linfócitos com *Ficoll Paque*®

Após a coleta, o sangue periférico foi diluído na proporção de 1:1 (6 mL de sangue: 6 mL de solução salina) em solução salina estéril 0,85%. A amostra foi homogeneizada por inversão e submetida a uma nova diluição em *Ficoll Paque*® (específico para o isolamento de linfócitos T) na proporção de 3:1 (3,5 mL de *Ficoll Paque*®: 10,5 mL de sangue diluído), sendo primeiramente acrescentado o *Ficoll* e então cuidadosamente o sangue diluído para evitar a mistura. Após este processo, os tubos com a amostra foram centrifugados a 1500 rpm por 30 minutos para separar os linfócitos de outros elementos sanguíneos. O aspecto obtido após a 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 *Ficoll* 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, homogeneizado por inversão e em seguida

diluído em solução de *Hanks* estéril na proporção de 3:1 (9 mL da solução de *Hanks*: 3 mL da mistura de plasma + linfócitos). Posteriormente, o material foi centrifugado a 1100 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado deixando 1 mL de conteúdo, o qual foi ressuspensionado em 4 mL de solução de *Hanks* e levado novamente para centrifugação a 1200 rpm por 5 minutos. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado por inversão e as células foram ressuspensionadas em 1 mL de meio de cultura RPMI 1640 estéril suplementado com 20% de SBF completo e 4% fito-hemaglutinina A. A concentração celular foi determinada pelo método de exclusão utilizando azul de *tripan* (10 µL da suspensão de células + 10 µL de azul de *tripan* 4%) e a contagem das células foi realizada com o auxílio de uma câmara de *Neubauer*.

3.4. Separação de Linfócitos por Decantação

O sangue da seringa foi transferido lentamente para dois tubos de ensaio esterilizados (10 mL em cada tubo). Após a transferência do sangue, os tubos foram fechados e cobertos com papel alumínio para evitar a exposição à luz. Desta forma, os tubos foram deixados em repouso por cerca de 2 horas à temperatura ambiente, a fim de se obter o plasma separado das hemácias. Após este tempo foram obtidas duas fases: as hemácias (cor vermelha) na fase inferior e o plasma (cor amarela) na superior. Com auxílio de uma pipeta *Pasteur*, o plasma foi cuidadosamente retirado dos dois tubos de ensaio e transferidos para um terceiro tubo de ensaio estéril, havendo o cuidado de se coletar a película de células sobre as hemácias.

3.5. Teste de Viabilidade Celular

Para a avaliação deste parâmetro foi utilizado o teste do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (Amresco). O princípio do método é a redução de um substrato amarelo, o sal de tetrazolium MTT, por enzimas mitocondriais resultando em um produto azul/roxo chamado formazana que pode ser quantificado por espectrofotometria. Desta forma esta reação ocorre somente em células vivas e que estejam com suas mitocôndrias ativas, configurando-se assim um ensaio versátil e quantitativo para avaliação da viabilidade celular (Mosmann, 1983).

Os linfócitos isolados com *Ficoll Paque*® foram cultivados em placas de cultura de 96 poços (Corning) a uma concentração de $0,5 \times 10^6$ células/poço e incubados durante 24 horas em meio completo (RPMI 1640 + 20% soro bovino fetal + 4% fito-hemaglutinina A) em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Após o período inicial de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações de julocrotina durante 24 horas. Após o tratamento, 100 µL de MTT (5000 µg/mL) foram acrescentados às células por 3 horas. Em seguida, o MTT foi retirado e foram acrescentados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma®) por uma hora, com o objetivo de dissolver a formazana obtida durante o processo. O DMSO foi então lido em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 562 nm (Valadares *et al.*, 2007). A sobrevivência celular foi calculada como a porcentagem de absorbância em relação à absorbância do controle. As concentrações de julocrotina utilizadas foram: 19,75; 39,5; 79; 158; 316; 632 e 1.264 µM. Tais concentrações foram definidas a partir do trabalho previamente publicado por Guimarães *et al.* (2010). Como controle positivo foi utilizado a nitrosometilurea (NMU), um composto alquilante carcinogênico.

3.6. Ensaio do Cometa (versão alcalina)

3.6.1. Princípio da Técnica

Esta técnica foi desenvolvida por Singh *et al.* (1988) e, posteriormente, modificada por Anderson *et al.* (1994). A técnica 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).

3.6.2. 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 será diluída. Os linfócitos obtidos por decantação foram cultivados em meio RPMI completo por 20 horas. Após 20 horas, diferentes concentrações de julocrotina (79, 158, 316 e 632 μM) foram adicionadas as culturas por 3 horas. Após este período foram coletados 450 μL de amostra de cada grupo e em seguida feito uma centrifugação a 1000 rpm por 5 min. Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico doxorubicina a 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 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, e as lâminas 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 e protegida da luz.

3.6.3. 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 ≥ 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_2O

destilada gelada (4 °C) para a remoção dos resquícios da solução de eletroforese e em seguida transferidas para um novo mergulho em H₂O destilada gelada por 5 min para a neutralização.

3.6.4. 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.

3.6.6. Análise das Lâminas

As lâminas foram visualizadas em microscópio de fluorescência, analisando-se um total de 100 células. A análise foi feita pelo padrão de escores (que vai de 0-4) (Figura 4) de acordo com o tamanho e intensidade da cauda do cometa, que representa o nível de fragmentação de DNA, indicando o grau de lesão sofrido pela célula:

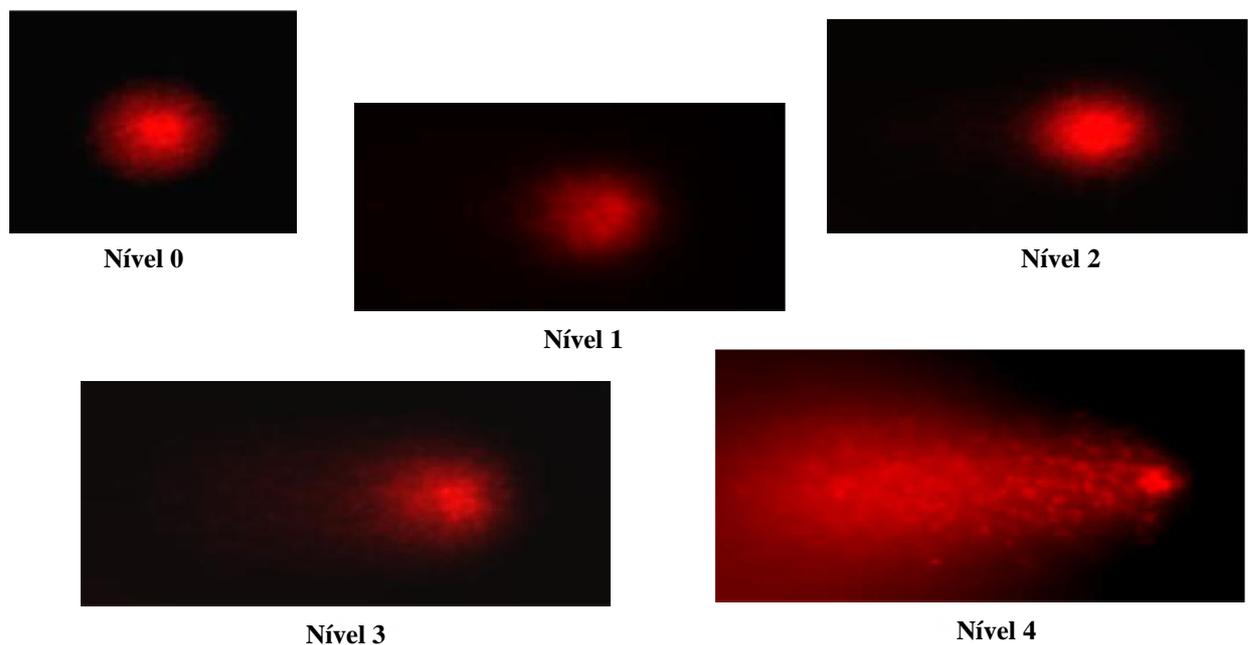


Figura 4: Padrão de escores utilizados para determinação do índice de dano no teste do cometa (Mota *et al.*, 2011).

- 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%)

3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

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

4. RESULTADOS

4.1. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

Os resultados dos ensaios de viabilidade celular, avaliados 24 horas após o tratamento com a julocrotina, demonstraram que não houve diminuição significativa nas porcentagens de sobrevivência (Figura 5). No entanto, uma diminuição estatisticamente significativa nas porcentagens de sobrevivência foi observada nos linfócitos após tratamento de 24 horas com o controle positivo NMU a partir da concentração de 316 μM . Os valores de viabilidade celular foram de 69,7; 78,4; 70,6; 64,2; 51,9; 45,7 e 11,7 % para o NMU e 121,3; 109,2; 115,4; 105,4; 115,2; 107,2 e 108,2 % para a julocrotina nas concentrações de 19,75; 39,5; 79; 158; 316; 632 e 1.264 μM , respectivamente.

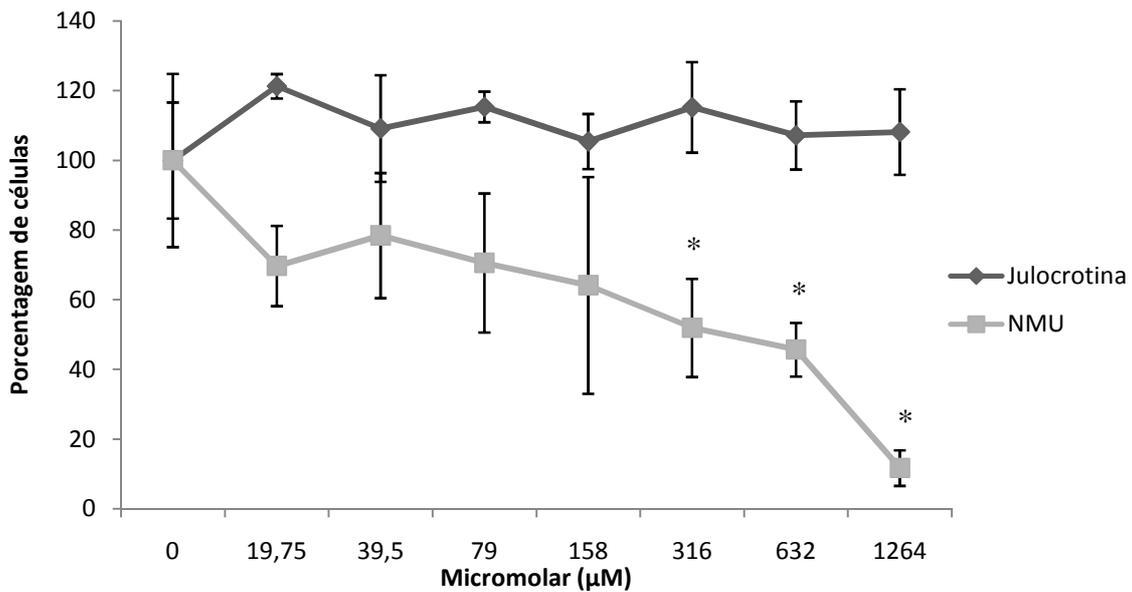


Figura 5: Valores de viabilidade celular observados em culturas de linfócitos humanos após 24 h de tratamento com diferentes concentrações de julocrotina e NMU. Média de três experimentos. * $p < 0,05$ (ANOVA/pós-teste Tukey) em relação ao controle negativo.

4.2. ENSAIO DO COMETA (VERSÃO ALCALINA)

Os resultados do teste do cometa, avaliados após o tratamento com a julocrotina, demonstraram que à medida que aumentaram as concentrações da julocrotina na cultura de linfócitos, houve também um aumento nos índices de danos no DNA destas células (Figura 6). Os valores dos índices de danos para cada indivíduo e para cada concentração de julocrotina estão descritos na Tabela 1. A única concentração que apresentou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no índice de dano em relação ao controle negativo (ID=0,78) foi a de 632 μM (ID=1,76). O tratamento com doxorubicina induziu um índice de dano de 1,80, sendo este valor também estatisticamente significativo em relação ao controle negativo (ID=0,78) ($p < 0,05$).

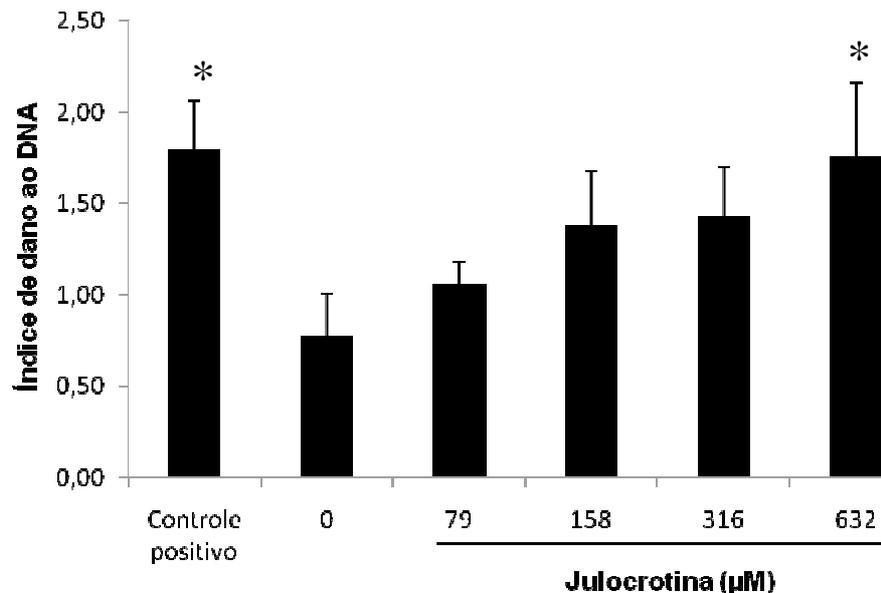


Figura 6: Efeito da julocrotina em cultura de linfócitos humanos analisado pelo ensaio do cometa. Média de três experimentos. * $p < 0,05$ (ANOVA/*pós*-teste Tukey) em relação ao controle negativo.

Tabela 1: Índice de dano ao DNA (ID) observado em linfócitos humanos após tratamento com julocrotina analisado pelo teste do cometa.

	Índice de Dano (ID)					
	Doxorrubicina (3µg/ml)	Controle	Julocrotina (µM)			
			79	158	316	632
Indivíduo 1	1,71	0,62	0,92	1,05	1,22	1,30
Indivíduo 2	2,09	1,04	1,12	1,51	1,33	1,91
Indivíduo 3	1,59	0,67	1,13	1,59	1,73	2,06
Média	1,80*	0,78	1,06	1,38	1,43	1,76*
Desv. Pad.	+/- 0,26	+/- 0,23	+/- 0,12	+/- 0,29	+/- 0,27	+/- 0,40

*p <0,05 (ANOVA/pós-teste Tukey) em relação ao controle.

5. DISCUSSÃO

A leishmaniose é considerada uma doença negligenciada e a segunda maior doença parasitária no mundo, cuja subnotificação ainda é alarmante com apenas 32 países apresentando notificação obrigatória, entre eles o Brasil (Holzmuller *et al.*, 2006; Clem, 2010). Os antimoniais pentavalentes permanecem como as drogas de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses há mais de 50 anos (Lima *et al.*, 2007). Embora a administração parenteral destes compostos continue a ser a terapia de primeira escolha para todas as leishmanioses, sua utilização vem sendo comprometida devido, principalmente, a resistência desenvolvida pelo parasita ao medicamento (Croft *et al.*, 2006, Mishra *et al.*, 2007).

Não havendo resposta satisfatória, com o tratamento pelo antimonial pentavalente, as drogas de segunda escolha são a Anfotericina B e o Isotionato de Pentamidina (FUNASA, 2002). Em geral estes compostos são tóxicos, de custo elevado, de difícil administração e podem também causar resistência ao parasito (Croft; Coombs 2003; Rath *et al.*, 2003). A internação prolongada e os efeitos adversos como alterações cardíacas, renais, pancreáticas e hepáticas dificultam a adesão ao tratamento das leishmanioses. Considerando as dificuldades de tratamento e a ausência de vacinas, há urgência na busca de novas drogas para o tratamento desta enfermidade (Carvalho; Ferreira, 2001; Paula *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2006). Assim, o estudo e utilização de práticas da medicina tradicional e a escolha de drogas derivadas de plantas devem aparecer como nova estratégia para o controle da leishmaniose (Mendonça-Filho *et al.*, 2004).

É sabido que os extratos de muitas plantas podem ser usados no tratamento de muitas doenças (Junqueira *et al.*, 2007), devido suas ações benéficas. No entanto, é importante verificar que alguns de seus constituintes podem ser tóxicos ao organismo. Além do mais, as plantas utilizadas para fins terapêuticos podem conter propriedades genotóxicas, causando alterações no DNA (Marques *et al.*, 2003). Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico e genotóxico induzido pela julocrotina – um alcalóide glutarimida encontrada na espécie *C. Pullei* com potente efeito leishmanicida – em linfócitos humanos utilizando os testes MTT e Cometa.

A Figura 5 apresenta o resultado do teste de viabilidade celular, avaliado pelo método MTT, em linfócitos humanos após 24 horas de tratamento com a julocrotina. Os dados demonstraram que a droga não foi citotóxica nas concentrações testadas. Guimarães *et al.* (2010), também usando o teste MTT, demonstraram que a julocrotina não foi citotóxica para macrófagos peritoneais de camundongo. Os autores utilizaram 79 μM de julocrotina por

períodos de 24, 48 e 72hr de tratamento. Porém, quando a julocrotina foi testada *in vitro* em promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, o alcalóide demonstrou ter atividade leishmanicida em concentrações que variavam de 79 a 316 μM . Os achados de Guimarães *et al.* (2010) indicam que a julocrotina tem a capacidade de se difundir através das membranas da célula e ser citotóxica para os parasitas intracelulares, mas não para a célula hospedeira. Segundo Croft e Coombs (2003), a nova quimioterapia antileishmania deve ter como alvo as formas amastigostas intracelulares que sobrevivem e se dividem nos macrófagos dos tecidos. A julocrotina parece preencher este requisito.

Efeitos moderados de citotoxicidade e até ausência de citotoxicidade de alcalóides, como a observada em nossos resultados, também foram verificados em outros estudos. Barreto *et al.* (2006) trataram astrócitos corticais de ratos por 24 e 72hr com o alcalóide pirrolizidínico monocrotalina e observaram que o mesmo não foi citotóxico mesmo na mais alta concentração (0,1 - 500 μM) no teste do MTT. Cavalcanti *et al.* (2008) em estudo recente, demonstraram que o alcalóide ingenamina G isolado da espécie *P. alcaloidefera* induziu um moderado efeito citotóxico em linfócitos humanos após 24h de tratamento, também utilizando o teste do MTT. Pitanga *et al.* (2011) após tratarem astrócitos de ratos com o alcalóide monocrotalina, demonstraram que após 24 hr de tratamento as células não foram afetadas. No entanto, após 72 hr de tratamento, houve uma redução considerável na viabilidade destas células na concentração de 100 μM .

A literatura tem mostrado que, no que tange a citotoxicidade, os resultados com alcalóides são bastante variáveis. No entanto, observa-se de maneira geral uma ação citotóxica específica destes compostos em células neoplásicas. Por exemplo, o estudo recente de Songsiang *et al.* (2011) demonstrou que os alcalóides carbazólicos claurailas A, B e C, isolados das raízes de *C. harmandiana* (planta medicinal usada na Tailândia) não apresentaram citotoxicidade para células KB (carcinoma epidermóide humano) e células Vero (rim de macaco verde africano). No entanto, a clauraila A mostrou-se citotóxica para células NCI-H187 (câncer de pulmão). Em estudo semelhante, Chakraborty *et al.* (2004) mostraram que o extrato de alcalóides totais isolados da raiz de *T. racemosa* (planta medicinal utilizada na Índia) não se mostrou citotóxico para linfócitos humanos. Todavia, tal extrato mostrou-se citotóxico para um painel de quatro células neoplásicas, a saber: HL-60 (leucemia aguda), K-562 (leucemia crônica), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e HeLa (carcinoma cervical).

O ensaio do cometa é um método bem reconhecido em estudos de toxicogenética devido as suas peculiaridades e vantagens, pois combina a simplicidade da técnica bioquímica de detecção de quebras de DNA com a utilização de poucas células (Burlinson *et al.*, 2007).

No presente estudo verificamos, através deste ensaio, que a julocrotina induziu dano significativo no DNA de linfócitos humanos apenas na maior concentração testada (632 μ M). Em estudos recentes, diversos autores usando o mesmo teste demonstraram resultados semelhantes aos nossos. Como exemplo podemos citar os resultado de Cavalcanti *et al.* (2008) que observaram que o alcalóide ingenamine G extraído da espécie *Pachychalina alcaloidifera* aumentou significativamente o índice de dano ao DNA em linfócitos humanos nas concentrações de 15 e 20 μ g/mL. Igualmente, o alcalóide vincristina, uma droga antineoplásica com efeitos genotóxicos, induziu dano significativo ao DNA também de linfócitos humanos (Wei *et al.*, 2008). Kleinsasser *et al.* (2005) ao avaliar células da tonsila e linfócitos humanos, após tratamento com o alcalóide nicotina, verificaram que o mesmo induz dano significativo no DNA destas células na concentração de 0,5 mM.

Além dos resultados acima mencionados, existem estudos que demonstram que os alcalóides, além de induzirem danos imediatos ao DNA, também são capazes de originar alterações mais complexas nos cromossomos de células eucarióticas. Por exemplo, a nicotina induz em células de ovário de hamster chinês (CHO), altas frequências de aberrações cromossômicas e trocas de cromátides irmãs (Trivedi *et al.*, 1990). Por outro lado, o alcalóide sulfato de vincristina induz altas frequências de linfócitos micronucleados. Utilizando sondas centroméricas, González-Cid *et al.* (1999), demonstraram que a maior parte destes micronúcleos era centrômero-positivo, o que evidencia o efeito aneugênico desta substância que interage com as proteínas microtubulares levando a uma distribuição anormal dos cromossomos e consequente aneuploidia.

Alcalóides são também conhecidos indutores de estresse oxidativo. Uma indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi verificada em células de glioblastoma humano (T98G) após tratamento das mesmas com a berberina, um alcalóide com propriedades antitumorais (Eom *et al.*, 2010). O alcalóide nicotina também é capaz de induzir estresse oxidativo em células do sistema nervoso central (Newman *et al.*, 2002), em células de cérebro de ratos (Bhagwat *et al.*, 1998) e em espermatozóides humanos (Arabi, 2004).

As ROS, ainda que produzidas durante o metabolismo aeróbico normal de células de mamíferos, estão implicadas em dano celular e tecidual. Os radicais livres produzidos por processos oxidativos podem atacar as bases ou açúcares do DNA, causando quebras de fitas simples que podem evoluir para quebras de fita dupla bem como sítios abásicos (Marshall *et al.*, 2009). Assim, sugerimos que os efeitos genotóxicos induzidos pela julocrotina, no presente estudo, podem ser devido à capacidade dos alcalóides de induzir ROS que podem danificar o DNA. A deoxiamfimedina, um alcalóide piridoacridina, demonstrou a capacidade

de induzir danos ao DNA após um significativo aumento na indução de ROS (Marshall *et al.*, 2009). Além disto, um dos prováveis mecanismos pelo qual a julocrotina induz seus efeitos leishmanicidas seria pela indução de ROS (Guimarães *et al.*, 2010)

Apesar da indução de ROS ser o mecanismo mais provável pelo qual a julocrotina induz seus efeitos genotóxicos, outros mecanismos também devem ser considerados. Já mencionamos previamente a capacidade dos alcalóides de induzir efeitos aneugênicos através de sua interação com as proteínas microtubulares (González-Cid *et al.*, 1999). Além disso, alcalóides piridoacridinas, além de induzir ROS, possuem a habilidade de se intercalar com o DNA e 1) alterar a topologia desta molécula; 2) modificar a maneira como as enzimas de metabolização do DNA interagem com o seu substrato, o que pode inibir muitos dos processos de metabolização desta molécula, incluindo síntese e topoisomerização (Marshall; Barrows, 2004).

Finalmente, os resultados do presente estudo parecem promissores no que diz respeito ao uso da julocrotina no tratamento da leishmaniose, pelo menos em relação aos seus efeitos citotóxicos, uma vez que não observamos tais efeitos em linfócitos periféricos, mesmo em concentrações bastante elevadas (i.e. 1264 μM). Como já citado anteriormente, Guimarães *et al.* (2010) demonstraram que a julocrotina na concentração de 79 μM também não foi citotóxica para macrófagos peritoneais de camundongos. No entanto, este alcalóide demonstrou um claro efeito genotóxico em células linfocitárias, ainda que em uma concentração muito elevada (632 μM), o que reforça a necessidade de se obter as devidas precauções quanto ao seu uso como fitoterápico leishmanicida.

6. CONCLUSÃO

A julocrotina demonstrou não ser citotóxica para os linfócitos humanos nas concentrações utilizadas neste estudo.

A julocrotina mostrou-se genotóxica para linfócitos humanos tratados com a concentração de 632 μ M da substância.

7. REFERÊNCIAS

- Akerele, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. *Herbal Gram*.1993;28:13-20.
- Albert B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*, 4ªed. Porto Alegre: Artmed; 2004. p. 945-1345.
- Al-Sabati K, Lloyd DC, Edwards AA, Stegnar P. A Survey of Lymphocyte Chromosomal Damage in Slovenian Workers Exposed to Occupational Clastogens. *Mutat Res*. 1992;280:215-223.
- Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, 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*. 1994;307:261-71.
- Arabi, M. Nicotinic infertility: assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Andrologia*. 2004; 36:305–10.
- Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, dos Santos AS. *Bioestat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: Sociedade Civil de Mamirauá, 5º edição, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, 2007.
- Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug Discovery from Medicinal Plants. *Life Sci*. 2005;78:431-41.
- Barbosa PS, Abreu AS, Batista EF, Guilhon GMSP, Muller AH, Arruda MSP, Santos LS, Arruda AC, Secco RS. Glutarimide Alkaloids and terpenoids from *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. *Biochem Syst Ecol*. 2007; 35:887–90.
- Barreto RA, Hughes JB, Sousa CS, Silva VDA, Silva AR, Veloso ES. O alcalóide monocrotalina, extraído de *Crotalaria retusa*, altera a expressão de GFAP, a morfologia e o crescimento de culturas primárias de astrócitos. *Rev Bras Saúde Prod*. 2006; 7:112–27.

- Bhagwat SV, Vijayasathya C, Raza H, Mullick J, Avadhani NC. Preferential effects of nicotine and 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone on mitochondrial glutathione S-transferase A4-4 induction and increased oxidative stress in the rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 1998; 56: 831–39.
- Boeira JM, Da Silva J, Erdtmann B, Henriques JA. Genotoxic effects of the alkaloids harman and harmine assessed by comet assay and chromosome aberration test in mammalian cells in vitro. *Pharmacol Toxicol.* 2001;89:287-94.
- Borris RP. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *J Ethnopharmacol.* 1996;51:29-38.
- Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, Escobar P, Honma M, Kumaravel TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Uno Y, Vasquez M, Hartmann A. In Vivo Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: results of the in vivo Comet Assay workgroup. *Mutat Res.* 2007;627:31-5.
- Calixto JB. Twenty-five of research on medicinal plants in Latin America. *J Ethnopharmacol.* 2005;100:31-34.
- Carvalho PB, Ferreira EI. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia.* 2001; 72: 599-18.
- Cavalcanti BC, Sombra CM, de Oliveira JH, Berlinck RG, de Moraes MO, Pessoa C. Cytotoxicity and genotoxicity of ingenamine G isolated from the Brazilian marine sponge *Pachychalina alcaloidifera*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2008;147:409-15.
- Chakraborty S, Roy M, Taraphdar AK, Bhattacharya RK. Cytotoxic effect of root extract of *Tiliacora racemosa* and oil of *Semecarpus anacardium* nut in human tumour cells. *Phytother Res.* 2004;18:595-600.
- Clem A. A current perspective on leishmaniasis. *J glob Infect Dis.* 2010; 2: 124-26.

- Cong Y, Guo L, Yang JY, Li L, Zhou YB, Chen J, Wang JH. Steroidal alkaloids from *Veratrum japonicum* with genotoxicity on brain cell DNA of the cerebellum and cerebral cortex in mice. *Planta Med.* 2007;73:1588-91.
- Cook PR, Brazell IA. Detection and repair of single-strand breaks in nuclear DNA. *Nature.* 1976;263:679-82.
- Cook PR, Brazell IA, Pawsey SA, Giannelli F. Changes induced by ultraviolet light in the superhelical DNA of lymphocytes from subjects with xeroderma pigmentosum and normal controls. *J Cell Sci.* 1978; 29:117-27.
- Cragg GM, Newman DJ. Natural products as source of new drugs over the periods 1981 – 2002. *J Nat Prod.* 2003; 66:1022-37.
- Croft S, Coombs G. Leishmaniasis, current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* 2003;19:502-08.
- Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 2006; 123:399-10.
- Delorenzi JC, Attias M, Gattass CR, Andrade M, Rezende C, Cunha-Pinto A; Henriques AT, Bouhabib DC, Saraiva EMB. Antileishmanial activity of a indole alkaloid from *Pesquiera australis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1349-54.
- Eom KS, Kim HJ, So HS, Park R, Kim TY. Berberine-induced apoptosis in human glioblastoma t98g cells is mediated by endoplasmic reticulum stress accompanying reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction. *Biol Pharm Bull.* 2010;33: 1644-49.
- Eriksson S, Nygren J, Ahnström G. Matrix association of early- and late-replicating chromatin studied by single-cell electrophoresis. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1590:103-8.
- Farias RA, Rao VS, Viana GS, Silveira ER, Maciel MA, Pinto AC. Hypoglycemic effect of trans-dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. *Planta Med.* 1997; 63:558-60.

- Funari CS, Ferro VO. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. *Rev Bras Farmacogn.* 2005;15:178-82.
- Fundação Nacional da Saúde. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2000, p.65.
- Fundação Nacional da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica/ Fundação Nacional da Saúde. 5. ed. Brasília. 2002. 842p.
- Gallenmüller F, Müller U, Rowe NP, Speck T. The growth form of *Croton pullei* (Euphorbiaceae) - Functional morphology and biomechanics of a neotropical Liana. *Plant Biology.* 2001;3:50-61.
- González-Cid M, Cuello MT, Larripa I. Comparison of the aneugenic effect of vinorelbine and vincristine in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis.* 1999; 14: 63-66.
- Guimarães APA, Dias FL, Cardoso RS, Kronka SN, Sakamoto-Hojo ET. Chromosomal Aberration Induced by 5-azacytidine Combined With VP-16 (etoposide) In CHO-K1 and XRS-5 Cell Lines. *Teratog Carcinog Mutag.* 2003; 23, 171-86.
- Guimarães LRC, Rodrigues APD, Marinho PSB, Muller AH, Guilhon GMS, Santos LS, Nascimento JLM, Silva EO. Activity of the julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton pullei* var. *glabrior*, on *Leishmania* (L.) *amazonensis*. *Parasitol Res.* 2010; 107: 1075-81.
- Holzmüller P, Bras-Gonçalves R, Lemesre JR. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. *Parasitology.* 2006; 132 Suppl:S19-32.
- Holetz FB, Pessoni GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias-Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97: 1027-31.

- Junqueira APF, Perazzo FF, Souza GHB, Maistro EL. Clastogenicity of Piper cubeba (Piperaceae) seed extract in an *in vivo* mammalian cell system. *Genetics and Mol Biol.* 2007; 30: 656-63.
- Kleinsasser NH, Wallner BC, Harréus UA, Zwickenpflug W, Richter E. Genotoxic effects of myosmine in human lymphocytes and upper aerodigestive tract epithelial cells. *Toxicology.* 2003; 192: 171-77.
- Kusamran WR, Tepswan A, Kupradinun P. Antimutagenic and anticarcinogenic potentials of some Thai Vegetables. *Mutat Res.* 1998; 402: 247-58.
- Lainson R, Shaw JJ 2005. Leishmaniasis in the New World. In L Collier, A Balows, M Sussman (eds), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 10th ed., Vol 5, *Parasitology*, Arnold, London, p. 313-349.
- Lima EB, Porto C, Motta JCO, Sampaio RNR. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. *An Bras Dermatol.* 2007; 82: 111-24.
- Little BJ. Ionizing Radiation. In: *Cancer Medicine*. Bast Jr RC, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei E. 5th edition. Ed. B.C. Decker Inc. 2400 pp. 2000.
- Marques RCP, Medeiros SRB, Dias CS, Filho JMB, Lima LFA. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames Test. *Mutat Res.* 2003; 536: 117-20.
- Marshall KM, Barrows LR. Biological activities of pyridoacridines. *Nat Prod Rep.* 2004; 21: 731-51.
- Marshall KM, Andjelic CD, Tasdemir D, Concepción GP, Ireland CM, Barrows LR. Deoxyamphimedine, a Pyridoacridine Alkaloid, Damages DNA via the Production of Reactive Oxygen Species. *Mar Drugs.* 2009; 7: 196-09.

- Matos JDM, Matos MEO. Farmacognosia - Curso teórico prático. Fortaleza: Edições UFC, p. 32. 1989.
- Mendonça-Filho RR, Rodrigues IA, Alviano DS, Santos ALS, Soares RMA, Alviano CS. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). *Res Microbiol.* 2004; 155: 136-43.
- Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, 2003.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasília : Ministério da Saúde, 2011.
- Mishra J, Saxena A, Singh S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr Med Chem.* 2007; 14: 1153-69.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55-63.
- Movajagh A, Maleki F, Mohammadzadeh SG, Fadari S. Association of Glutathione S-transferase and Chromosomal Aberrations as a Means to Determine Occupational Exposure. *Int. Congress Series.* 2005; 1276: 197-98.
- Moraes MO, Bezerra FAF, Lotufo Do O, Pessoa C, Moraes MEA. Avaliação clínica da eficácia e segurança de fitoterápicos no Brasil. *Arq Bras Fitomed Cient.* 2003; 1:30-8.
- Mota TC, Cardoso PC, Gomes LM, Vieira PC, Correa RM, Santana PD, Miranda MS, Burbano RM, Bahia MO. In vitro evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of artesunate, an antimalarial drug, in human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen.* 2011; 52: 590-4.

- Mshana NR, Abbiw DK, Addae-Mensah I, Adjanouhoun E, Ahyi MRA; Ekpere, JA, Enow-Orock EG, Gbile ZO, Noamesi GK, Odei MA, Odunlami H, Oteng-Yeboah AA, Sarpong K, Sofowora A, Tackie AN. Traditional medicine and pharmacopoeia: contribution to the revision of ethnobotanical and floristic studies in Ghana. Organization of African Unity/Scientific, Technical and Research Commission (OAU/STRC). 2000.
- Nakamura YK, Suganuma E, Kujama N, Sato K, Ohtsuki K. Comparative bio-antimutagenicity of common vegetables and traditional vegetables in Kyoto. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998; 62:1161-65.
- Natarajan AT. Techniques for Biomonitoring of Human Populations for Genetic Effects. *Rev Brasil Genet.* 1993;16: 841-47.
- Newman MB, Arendash G W, Shytle R D, Bickford PC, Tighe T. AND SANBERG P. R. Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. *Life Sci.* 2002; 71: 2807–20.
- Oliveira AB, Braga FC. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. *Arq Bras Fitomed Cient.* 2003; 1: 49-58.
- Organização Mundial da Saúde. Organización Mundial de La Salud. Situación regulamentaria de los medicamentos. *Resenã Mundial*, p. 62, 2000.
- Patwardhan B, Gautam M. Botanical immunodrugs: scope and opportunities. *Drug Discov Today.* 2005; 10: 495-02.
- Paula CDR, Sampaio JHD, Cardoso DRC, Sampaio RNR. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/Kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36: 365-71.

- Pelissari DM, Cechinel MP, Sousa-Gomes ML, Lima Júnior FEF. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2011; 20: 107-10.
- Pinho DS, Sturbelle RT, Martino-Roth MG, Garcias GL. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. *Ver Bras Farmacogn*. 2010; 20:165-70.
- Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VS, Lopes NP; Epifano RA. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quim. Nova*, v. 25, supl.1, p. 45-61. 2002.
- Pitanga BP, Silva VD, Souza CS, Junqueira HA, Fragomeni BO, Nascimento RP, Silva AR, Costa MD, El-Bachá RS, Costa SL. Assessment of neurotoxicity of monocrotaline, an alkaloid extracted from *Crotalaria retusa* in astrocyte/neuron co-culture system. *Neurotoxicology*. 2011.
- Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tomazela DM, Jesus MN, Marzal PC, Andrade Júnior HF, Tempone AG. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quim Nova*. 2003; 26:550-53.
- Razin SV, Gromova II, Iarovaia OV. Specificity and functional significance of DNA interaction with the nuclear matrix: new approaches to clarify the old questions. *Int Rev Cytol*. 1995; 162 B: 405-48.
- Rocha FF, Neves EMN, Costa EA, Matos LG, Müller AH, Guilhon GMSP, Cortes WS, Vanderlinde FA. Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae). *Rev Bras Farmacogn*. 2008; 18: 344-9.
- Rocha LGR, Aragão CFS, Loiola MIB, Bezerril RA, Paiva NRF, Holanda CMCX, Brito MEF. Evaluation of the leishmanicide action of ethanol extracts of *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae). *Rev Bra Farmacogn*. 2009; 19:51-6.

- Santos-Mello R, Deimling LI, Lauer-Junior CM, Almeida A. Induction of micronuclei by alkaloids extracted from *Senecio brasiliensis* and stored for 23 years. *Mutat Res.* 2002;516: 23-8.
- Secco RS. Bol. Museu Paraense Emílio Goeldi, *Ser. Bot.* v. 8, p. 265. 1992.
- Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. (org.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2001.
- Singh MP, McCoy MT, Tice RR, Schneider P. A simple technique for quantitation of low levels of DNA in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988;175: 184-91.
- Soares AKA, Carmo GC, Quental DP, Nascimento DF, Bezerra FAF, Moraes MO, Moraes MEA. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. *Rev Bras Farmacogn.* 2006;16: 447-54.
- Songsiang U, Thongthoom T, Boonyarat C, Yenjai C, Claurailas A-D, cytotoxic carbazole alkaloids from the roots of *Clausena harmandiana*. *J Nat Prod.*2011; 74: 208-12.
- Teixeira RO, Camparoto ML, Mantovani MS, Vicentini VEP. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. in *in vivo* assays. *Genet Mol Biol.* 2003;26:551-55.
- Trivedi AH, Dave BJ, and Adhvaryu SG. Assessment of genotoxicity of nicotine employing in vitro mammalian test system. *Cancer Lett.* 1990; 54: 89–94.
- Turolla MSR, Nascimento ES. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Braz J Pharm Sci.* 2006; 42: 289-306.
- Van Den Berg ME. Plantas Medicinas na Amazônia, contribuição ao seu conhecimento sistemático, 2º Ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi (coleção Adolpho Ducke), v. 168, p.124-25, 1993.

- Valadares MC, Castro CN, Cunha LC. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 2007; 43: 631-38.
- Vicentini VEP, Camparoto ML, Teixeira RO, Mantovani MS. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. *Acta Scientiarum.* 2001; 23: 593-98.
- Vogelstein B, Pardoll DM, Coffey DS. Supercoiled loops and eucaryotic DNA replicaton. *Cell.* 1980; 22: 79 – 85.
- Wei J, Yezheng L, Zhijian C, Shijie C, Meibian Z, Lifen J, Jianlin L, Jiliang H. Studying the genotoxicity of vincristine on human lymphocytes using comet assay, micronucleus assay and TCR gene mutation test in vitro. *Toxicology.* 2008; 252: 113–17.
- 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.* 2009; 679:18 – 23.
- World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. [Acessado em set. 2011]. Disponível em http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/

