



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



EFEITO GENOTÓXICO DA ARTEMISININA E DO ARTESUNATO EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS.

IVANI AQUINO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas*.

Orientador: *Prof. Dr. Edson Luis Maistro*

BOTUCATU – SP

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**EFEITO GENOTÓXICO DA ARTEMISININA E DO
ARTESUNATO EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS.**

IVANI AQUINO

PROF. DR. EDSON LUIS MAISTRO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, como requisito parcial
para obtenção de título de Mestre em Biologia Geral e
Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas*.

Prof. Dr. Edson Luis Maistro

BOTUCATU – SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Aquino, Ivani.

Efeito genotóxico da artemisinina e do artesunato em células de mamíferos
/ Ivani Aquino. – Botucatu, 2010

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Edson Luis Maistro

Capes: 20206003

1. Mutagênese. 2. Mamífero. 3. Artemísia. 4. Célula.

Palavras chave: Genotoxicidade; HepG2; Artemisinina; Artesunato.

*Dedico este trabalho à minha mãe, que me apoiou incondicionalmente
em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me fez instrumento da vossa fé. Confiando Nele é possível realizar todos os nossos sonhos. Basta seguir seus ensinamentos e acreditar sempre.

À minha família, em especial minha mãe, que tanto ouviu, tanto ajudou, muitas vezes sem nem entender o real motivo dos meus lamentos!!! Obrigada por acreditar no meu trabalho e na minha profissão.

Ao meu namorado Luiz Fernando, que me apoiou desde o começo da minha vida itinerante durante estes 2 anos de mestrado. Obrigada pela compreensão em todos os momentos, por cada palavra ouvida, por todas as infinitas mensagens que alegravam meu dia quando estava longe.

Ao meu orientador, Prof. Edson Luis Maistro, pela oportunidade de realizar o mestrado, pela confiança e por me ajudar a manter o foco.

Ao Prof. Mário Sérgio Mantovani, responsável pelo Laboratório de Genética Toxicológica - UEL, que além de me receber tão bem em seu laboratório contribuiu muito com meu aprendizado no cultivo celular.

Aos colegas de laboratório em Marília, pelas conversas e pela companhia em Marília e também em Botucatu, sempre descontraída!

Em especial ao Rafael Palhano Fedato, amigo de laboratório em Marília, por todas as considerações, conselhos, apoio, caronas e companhia até mesmo para o supermercado!!!

Você tem grande importância no meu crescimento profissional. Obrigada pela amizade, dedicação e saiba que torço muito pelo teu sucesso!!!

À Marcela Tsuboy, pela amizade e acolhimento no Laboratório de Genética Toxicológica, na UEL. Os experimentos in vitro que pareciam nunca acabar ("será que esta é a última semana?"). Nunca esquecerei a semana de Natal e Ano Novo, todos tão preocupados com as festas e você me ajudando pra caramba! Muito obrigada pela ajuda nas horas mais improváveis! Você é extremamente profissional, competente, inteligente e torço muitíssimo pelo teu sucesso. Obrigada pela ótima companhia em todos os momentos, até mesmo em Marília! Obrigada por todo apoio e companhia. Nunca esquecerei os almoços na cantina do CESA, junto a você e a Juliana!

À Juliana Marcarini, do Laboratório de Genética Toxicológica – UEL, por me iniciar no "convívio" com as "filhas" HepG2, junto com a Marcela. Por todos os fins de semana de experimentos, por ouvir meus lamentos e por sempre dizer "vai dar certo"! A sua dedicação e competência com certeza fazem parte deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, do IB da UNESP de Botucatu, pela oportunidade de conviver com essa instituição tão renomada e pela excelente formação a que tive acesso. Agradeço também à Seção de Pós-Graduação, em especial a Lu, ao Herivaldo, e ao Davi, por todos os atendimentos.

Ao CNPq, pela bolsa que proporcionou dedicação total aos experimentos.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1 - Fontes de exposição humana a agentes mutagênicos.....	16
Figura 2 - A origem do micronúcleo.....	21
Figura 3 – Estrutura da Artemisinina e seus derivados.....	25
ARTIGO 1 – Migração do DNA no Ensaio Cometa para a determinação de genotoxicidade do Artesunato em células de sangue periférico (coletadas após 24h de tratamento), de camundongos Suíços machos, <i>in vivo</i>	54
ARTIGO 1 - Migração do DNA no Ensaio Cometa para a determinação de genotoxicidade do Artesunato em células de fígado (coletadas após 24h de tratamento), de camundongos Suíços machos, <i>in vivo</i>	55
ARTIGO 1 – Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) observados em células de medula óssea de camundongos Suíços machos tratados com Artesunato e controles.....	56
ARTIGO 2 - Total e scores de danos em células HepG2 tratadas com Artemisinina (ATM) e Artesunato (ART), coletadas após 3h de tratamento.....	73
ARTIGO 2 - Resultados das médias das duplicatas do Ensaio de Citotoxicidade com Resazurina.....	74
ARTIGO 2 - Expressão relativa dos RNAm de <i>CASP3</i> e <i>SOD1</i> , quantificado por PCR em tempo real na linhagem HepG2.....	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ACT** – Terapia combinada com artemisinina
- ATM** – Artemisinina
- ART** – Artesunato
- CASP3** – Caspase 3
- cDNA** – *Complementary DNA* (DNA complementar)
- CFPAC-1** - *Pancreatic Duct Adenocarcinoma* (Adenocarcinoma do Ducto Pancreático)
- CHO-9** – *Chinese Hamster Ovary* (Ovário de Hamster Chinês)
- CHO** – Wild-type *Chinese Hamster Ovary* (Ovário de Hamster Selvagem Chinês)
- CYP** – Citocromo p450
- CYP1A1** – Citocromo P450, subfamília 1A, polipeptídeo 1
- DEPC** - *diethylpyrocarbonate* (Dietilpirocarbonato)
- DHA** – *Docosahexaenoic Acid* (Ácido docosahexaenoico)
- DMPA** - N, N-dimetilaminopiridina
- DMSO** - Dimetilsulfóxido
- DNA** – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)
- DNTP** - 2'- desoxinucleotídeos 5' – trifosfato, sal de sódio
- DRX** – Doxorrubicina
- EPA** – *Environmental Protection Agency, U.S.* (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)
- FAMEMA** – Faculdade de Medicina de Marília
- HTC** - *Rattus norvegicus hepatoma* (Hepatoma de rato)
- HepG2** - *Human hepatocellular liver carcinoma cell line* (Hepatoma humano)
- LMP** - *Low melting point* (Agarose de baixo ponto de fusão)
- MEM** - *Minimum Essential Medium*
- MN** – Micronúcleo
- MNPCE** – Eritrócito Policromático Micronucleado
- NCE** – Eritrócito normocromático
- NMP** - *Normal Melting Point Agarose* (Agarose de ponto de fusão normal)
- nm** - Nanômetro
- OVCAR** – Human ovarian carcinoma (Carcinoma de ovário humano)
- OMS** – Organização Mundial da Saúde

Panc-1 - *Human Pancreas Epithelioid Duct Carcinoma* (Carcinoma de ducto pancreático humano)

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PCE - Eritrócito policromático

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia de polimerase)

qRT-PCR - *Quantitative Reverse Transcriptase PCR* (Reação em cadeia de polimerase quantitativo em tempo real)

pH - Potencial hidrogeniônico

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucléico)

RNA_m – RNA mensageiro

RNA_r – RNA ribossômico

SCGE – *Single Cell Gel Eletrophoresis*

SOD1 – *Superoxide Dismutase*

V79-2 – *Hamster Lung Fibroblast* (Fibroblasto de pulmão de Hamster)

µg/mL – Micrograma por mililitro

µM - Micromolar

Resumo

O tratamento para combater a Malária, recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), é feito com medicamentos derivados da artemisinina (tais como o artesunato), o princípio ativo extraído da *Artemisia annua*. Com base nesta informação, foi avaliado neste projeto o potencial genotóxico da artemisinina (ATM) e do artesunato (ART) em células HepG2 (*Human hepatocellular liver carcinoma cell line*), *in vitro*, além da investigação do potencial genotóxico e/ou mutagênico do artesunato, em células de camundongos *in vivo*. Nestas análises foram utilizados o ensaio cometa e o teste de micronúcleo, para a verificação da genotoxicidade e mutagenicidade; nos ensaios *in vitro*, também foram realizados testes de citotoxicidade e análise da expressão dos genes SOD1 e Casp3. Nos ensaios *in vivo*, utilizando camundongos tratados com ART, foi verificado através do Ensaio Cometa que, nas células de sangue periférico, apenas a maior dose testada (2000mg/kg) foi genotóxica, quando comparada ao grupo controle negativo. Já nas células de fígado, as doses de 5mg, 50mg e 2000mg/kg mostraram-se genotóxicas, com $p < 0,05$. Quanto à mutagenicidade, os tratamentos com ART nas doses de 50mg, 100mg e 2000mg/kg apresentaram aumento significativo no número de células micronucleadas em relação ao grupo controle. Nos testes *in vitro*, os resultados do ensaio cometa com a ATM e o ART mostraram um aumento significativo ($p < 0,001$) no número de células com danos no DNA, em relação ao controle negativo, em todos os tratamentos e para ambas as substâncias, o que indica um efeito genotóxico da ATM e do ART. Já na análise da expressão gênica, houve um aumento na expressão de Caspase 3, nas células tratadas com as duas substâncias, porém, a expressão de SOD1 foi maior em células tratadas com ATM, enquanto nas células tratadas com o ART, houve uma diminuição na expressão deste gene. Apesar da análise da expressão gênica não ter atingido significância estatística na concentração de ATM e ART estudadas, elas ajudam a entender um pouco do mecanismo de ação destas substâncias. Os resultados obtidos permitem concluir que, tanto o ART quanto a ATM, produziram efeitos genotóxicos em células metabolizadoras, além de apresentar efeitos citotóxicos e, *in vitro*, não alteraram estatisticamente a expressão de RNAm do gene Casp3, proteína efetora na cascata apoptótica e também o SOD1, gene que produz enzimas antioxidantes, podendo indicar que em concentrações maiores, a citotoxicidade encontrada pode ter relação com os elevados danos no DNA que, por sua vez, desencadeiam a via de apoptose e citotoxicidade.

Abstract

The treatment to combat malaria, recommended by the World Health Organization (WHO), is done with drugs artemisinin derivatives (such as artesunate), the active ingredient extracted from *Artemisia annua*. Based on this information, and the lack of data on genotoxicity of these compounds in mammalian cells, was evaluated in this project the genotoxic potential of artemisinin (ATM) and artesunate (ART) in HepG2 cells (Human Hepatocellular liver carcinoma cell line), *in vitro* as well as investigating the potential genotoxic and / or mutagenic of artesunate, in mice *in vivo*. In these tests we used the comet assay and micronucleus test, to check the genotoxicity and mutagenicity, *in vitro* assays were also performed cytotoxicity tests and analysis of genes expression SOD1 and Casp3. *In vivo* tests using mice treated with ART, was determined using the Comet assay that in peripheral blood cells, only the highest dose tested (2000mg/kg) was genotoxic when compared to negative control group. Already in the liver cells, doses of 5mg, 50mg and 2000mg/kg were shown to be genotoxic, $p < 0.05$. For mutagenicity, treatment with ART in doses of 50mg, 100mg and 2000mg/kg showed a significant increase in the number of micronucleated cells in the control group. *In vitro* tests, the results of the comet assay with the ATM and ART showed a significant increase ($p < 0.001$) in the number of cells with DNA damage, compared to negative control in all treatments and for both substances, the indicates that a genotoxic effect of ATM and ART. The analysis of gene expression, there was an increase in the expression of Caspase 3, in cells treated with both substances, however, the expression of SOD1 was higher in cells treated with ATM, whereas in cells treated with ART, there was a decrease in expression of this gene. Although the analysis of gene expression did not reach statistical significance in the concentration of ATM and ART studied, they help to understand a little of the mechanism of action of these substances. The results showed that both the ART and the ATM, produced genotoxic effects in metabolizing cells, besides its cytotoxic and, *in vitro*, not statistically altered the mRNA expression of the gene Casp3, effector protein in the apoptotic cascade and also the SOD1, gene that produces antioxidant enzymes, which may indicate that at higher concentrations, the cytotoxicity observed may be related to high DNA damage which, in turn, trigger the pathway of apoptosis and cytotoxicity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.2 Mutação.....	14
1.2.1 Mutagênese.....	15
1.3 Testes mais comuns para a avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade.....	17
1.3.1 Ensaio Cometa – SCGE.....	18
1.3.2 Teste do Micronúcleo – MN.....	20
1.4 Apoptose e danos celulares – CASPASE 3 e SOD1.....	22
1.5 Artemisinina e Artesunato.....	24
2. OBJETIVO.....	26
2.1 Objetivos específicos.....	26
3. REFERÊNCIAS.....	27
4. ARTIGO 1 - <i>Genotoxicity assessment of the antimalaric compound artesunate in somatic cells of mice</i>.....	37
5. ARTIGO 2 - Expressão de Casp3 e SOD1 e efeito genotóxico da artemisinina e do artesunato em células HepG2.....	57
6. ANEXOS.....	75
ANEXO 1 – Carta de submissão do artigo “<i>Genotoxicity assessment of the antimalaric compound artesunate in somatic cells of mice</i>” ao <i>Journal of Applied Toxicology</i>.....	76
ANEXO 2 – Parecer do Comitê de Ética Experimental da Faculdade de Medicina de Marília, SP.....	77
ANEXO 3 – Protocolo para extração de RNA de cultura de células.....	78

1. INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, o contato do homem com um grande número de agentes químicos, físicos e biológicos tornou-se constante. Estes agentes podem interagir de várias maneiras com o organismo humano e, por consequência, atuar de maneira benéfica, neutra ou prejudicial (NEGRAES, 2003). A utilização cada vez mais acentuada de produtos como fármacos, agroquímicos, cosméticos, corantes e muitos outros, tem demonstrado aumento nas taxas de mutagênese ambiental (RIBEIRO et al., 2003). Evidências crescentes sugerem que o dano no DNA, expresso principalmente como mutações, está envolvido na indução de muitos tipos de câncer (BARTSCH; TOMATIS, 1983; SARASIN, 2003). Por este motivo, a avaliação da mutagenicidade ganha cada vez mais importância à medida que a sociedade se desenvolve e o número de substâncias externas ao organismo humano cresce (REIFFERSCHIED & HEIL, 1996). Dentre estes agentes pode-se salientar os produtos naturais, que são usados dentro da medicina tradicional de muitos países, e o uso de medicamentos alternativos para o tratamento de várias doenças, ações que estão cada vez mais populares (JUNQUEIRA et al., 2007).

No Brasil, muitas plantas são utilizadas como extratos, emplastos e infusões, sem evidências científicas que comprovem a eficácia desses tratamentos (HOLETZ et al., 2002). O aumento do uso de fitoterápicos tem sido relacionado a alguns fatores, tais como: (1) a crença de que os fitoterápicos são inócuos, em contraste com as drogas convencionais, (2) a idéia de que o que é natural só pode ser bom, (3) a atenção especial dada aos fitoterápicos nos países ocidentais por movimentos ecológicos e (4) a crença de que os fitoterápicos são naturalmente superiores às drogas sintéticas (CAPASSO, 2000).

Apesar de muitas ações benéficas das plantas, é importante verificar que alguns de seus constituintes podem ser tóxicos ao organismo, e o metabolismo vegetal também pode gerar metabólitos com esta mesma atividade. Segundo Ames (1983), elementos presentes em vegetais da dieta humana, além de outros tóxicos como medicinais, apresentam substâncias nocivas para o organismo. Plantas utilizadas por um grande número de pessoas podem possuir propriedades farmacológicas e, simultaneamente, também estar causando alterações no DNA (MARQUES et al., 2003).

Para garantir a segurança terapêutica de um agente farmacológico, natural ou sintético, deve ser comprovado que o seu uso não traz agravos à saúde humana por meio de estudos farmacológicos, histopatológicos e toxicológicos, sendo então necessária a avaliação de uma

possível atividade genotóxica e/ou mutagênica deste agente. Esta prática é de especial importância no caso de produtos derivados das plantas medicinais, pois estas sintetizam substâncias tóxicas que, na natureza, possuem o papel de defesa contra a herbivoria e outros agentes patogênicos (KRICHER, 1997). Além disso, as plantas contêm inúmeros constituintes em seus extratos que, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos, devido à presença de compostos de classes ou estruturas diferentes (MACIEL, 2002). A fitoterapia deve, então, ser acompanhada de estudos científicos que levem em consideração e correlacionem pesquisas de qualidade, eficácia e segurança (KHAN, 2006).

A Genética Toxicológica é uma das áreas da ciência que tem se dedicado a pesquisa das propriedades genotóxicas e mutagênicas de agentes aos quais os organismos estão expostos, fazendo uso de diversos ensaios que avaliam o dano que estes podem vir a causar ao DNA na presença ou ausência de sistemas de metabolização (COSTA, 2006).

Para avaliar a segurança no uso dessas substâncias, são utilizados testes de genotoxicidade, como o Ensaio cometa ou *Single-Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) e mutagenicidade, como o Teste do Micronúcleo, *in vivo*, utilizando, em geral, células de mamíferos, geralmente camundongos, ou *in vitro*, quando se pode utilizar toda uma gama de linhagens celulares, de roedores e humanos (metabolizadoras, como HTC e HepG2; ou não metabolizadoras, como as de ovário, CHO e OVCAR).

Deste modo, estudos de genotoxicidade ajudam na avaliação da segurança e efetividade dos produtos naturais (BAST, 2002). Por isso, a avaliação do potencial genotóxico/mutagênico dos agentes terapêuticos, naturais ou sintéticos, é recomendada por órgãos reguladores nacionais e internacionais (CNS, RESOLUÇÃO Nº 251/97; OECD, 2007). Tendo em vista que os agentes mutagênicos estão direta ou indiretamente ligados a carcinogênese (TRICHOPOULOU et al., 1995), o estudo de substâncias antígenotóxicas abre um leque muito grande de possibilidades no que se refere a redução do número de casos de neoplasias, na diminuição do tempo ou mesmo no aumento da eficácia do tratamento das pessoas acometidas com esse tipo de doença.

Os testes de genotoxicidade/mutagenicidade são, portanto, de particular importância, pois são capazes de detectarem compostos que induzem danos genéticos direta (metabolização) ou indiretamente (biotransformação) por diversos mecanismos.

1.2 MUTAÇÃO

Uma mutação é definida quando surge uma alteração no DNA, que não é resultado dos processos naturais de recombinação e segregação e pode modificar ou não a atividade normal da unidade genética onde ocorreu (cromossomo ou gene) (LEWIN, 2000). As mutações podem acarretar efeitos prejudiciais ao homem, tais como: malformações congênitas, anomalias e distúrbios metabólicos de origem genética, como o câncer, resistência a medicamentos em bactérias, vírus ou parasitas, entre outros.

As mutações podem ocorrer tanto em células somáticas como em células germinativas. Porém, apenas as mutações em células germinativas podem ser perpetuadas entre as gerações, sendo essas mutações as responsáveis pelas doenças hereditárias. Define-se Mutação Cromossômica como sendo aquelas em que há quebra ou rearranjo cromossômico e Mutação Gênica quando ocorre a alteração de um alelo de um gene, tornando-se um alelo diferente, sendo chamada também de “mutação de ponto”, uma vez que tal alteração ocorre dentro de um único gene e está em um *locus* cromossômico (ponto) (GRIFFITHS et al., 2001; NUSSBAUM et al., 2006).

Lesões persistentes no DNA levam a um aumento da mutagênese pela maior probabilidade de ocorrerem erros quando a replicação ocorrer em um molde alterado. Com o objetivo de manter o genoma íntegro, as células desenvolveram mecanismos de reparação de danos ao DNA (PINTO; FELZENSZWALB, 2003).

Sabe-se hoje que mutações gênicas atuam em etapas da carcinogênese e que os ensaios que detectam componentes genotóxicos possibilitam identificar substâncias que apresentam riscos à saúde (CARDOSO, 2006). A avaliação da genotoxicidade de vários compostos pode fornecer informações de grande interesse, permitindo, dessa maneira, o conhecimento do risco em potencial a população humana (MALUF; ERDTMAN, 2003).

Por outro lado, as mutações representam a principal fonte de diversidade genética que, em conjunto com a seleção natural, permite que os organismos se adaptem às contínuas mudanças no ambiente, sendo, portanto, um elemento benéfico e fundamental para o qualquer espécie viva na natureza (PACHECO et al., 2009). Ou seja, as mutações fornecem a variação genética na qual a seleção da evolução opera (GRIFFITHS et al., 2001).

1.2.1 MUTAGÊNESE

A mutagênese é a ciência que estuda o processo de indução de danos no DNA pela ação de agentes químicos, físicos e biológicos, podendo resultar em mudanças hereditárias ao organismo (ZEIGER, 2007; SCCNFP, 2003). Muitas mutações passam despercebidas, pois

não implicam em mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo, mesmo aquelas que resultam em morte celular. À medida que aumenta a quantidade de substâncias atribuídas ao consumo humano, se torna imprescindível a identificação dos agentes potencialmente mutagênicos (REIFFERSCHIED & HEIL, 1996). A mutação consiste em toda alteração do material genético que não resulta dos processos de segregação ou recombinação, capaz de influenciar ou não a atividade normal da unidade genética onde ocorreu (LEWIN, 2000). Qualquer substância capaz de reduzir a frequência de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente do mecanismo de ação, é considerada antimutagênica (DE FLORA, 1998). Já os chamados agentes mutagênicos alteram a sequência nucleotídica, podendo acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias (RIBEIRO et al., 2003).

TIPO	EXEMPLO
Endógenos	Óxido Nítrico Radicais livres de oxigênio Formação de nitrosaminas endógenas
Ocupacional	Produtos Petroquímicos Produção de energia nuclear Produção de ferro e aço
Dieta	Mutágenos naturais presentes na dieta Mutágenos gerados durante o cozimento de alimentos Mutágenos gerados no processo de conservação dos alimentos
Radiação	Exposição médica – Raio X Exposição a lixo nuclear
Poluição	Efluentes industriais Sub – produtos da cloração da água Emissões por motores de veículos Pesticidas usados na agricultura Incineração de lixo
Biológico	Mutágenos originados de infecção crônica por vírus, bactérias ou parasitas

Figura 1. Fontes de exposição humana a agentes mutagênicos. Extraído de Ribeiro & Marques, 2003.

Um agente mutagênico é capaz de produzir diferentes eventos mutacionais em organismos com constituição genética distintas. Contudo, a maior parte destes agentes exibem um espectro de mutações característico, que depende de vários fatores, incluindo a natureza das alterações primárias no DNA (por ex.: modificações de base, de resíduos de açúcar ou

fosfato, quebras de filamentos, ou incorporações de bases modificadas), e os efeitos secundários causados pela resposta do organismo a estas modificações. Estes efeitos secundários podem incluir a ação de várias formas de reparo do material genético e a duplicação de cromossomos sobre moldes modificados (PRESTON et al., 1987; ZAHA, 1996). Esses agentes podem interagir diretamente com a molécula de DNA ou tornar-se mutagênicos ao sofrer reações metabólicas no organismo vivo (VARELLA et al., 2004). Na **figura 1**, são apresentados exemplos de fontes de exposição humana a agentes mutagênicos.

Por isso, conhecer a propriedade mutagênica das substâncias ingeridas ou utilizadas pela população constitui um importante meio de prevenção do desenvolvimento do câncer.

1.3 TESTES MAIS COMUNS PARA AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE

Os testes de genotoxicidade e mutagenicidade fazem parte da bateria de estudos não clínicos de segurança durante o desenvolvimento de medicamentos (ANVISA, 2010). A mutagenicidade de substâncias químicas pode ser avaliada através de testes com microorganismos e em organismos superiores. Os ensaios com microorganismos avaliam basicamente o dano provocado ao DNA pelo agente indutor ou pelos produtos de biotransformação. Já o estudo do potencial genotóxico de compostos em ensaios com animais de laboratório oferece grandes vantagens, especialmente a de reproduzir as condições de exposição e metabolização do homem (NTP, 1999; MULLER; STREFFER, 1994).

Valentin-Severin (2003) salientaram que a diferença entre os testes do cometa e do micronúcleo consiste basicamente no tipo de alteração detectada no DNA: o teste do cometa detecta lesões primárias, que muitas vezes são reparáveis, enquanto o teste do micronúcleo detecta lesões irreparáveis. O ensaio cometa e o teste do micronúcleo têm grande aceitação na comunidade científica; porém, aspectos envolvendo a escolha da metodologia, *in vivo* ou *in vitro*, devem ser avaliados. Sempre que for possível, aliar teste *in vivo* e *in vitro* de uma mesma substância é muito interessante, a fim de verificar a existência de cofatores na metabolização, ou mesmo se a substância independe da metabolização para que ocorra o efeito.

1.3.1 ENSAIO COMETA – SCGE

O Ensaio Cometa, também chamado *Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)* consiste em uma técnica simples e sensível para a detecção de danos primários no DNA que tem sido amplamente utilizada na genética toxicológica por ser um ótimo método capaz de detectar um amplo espectro de danos no DNA, ser adaptável a diversas espécies, sensível, rápido e de baixo custo (COLLINS et al., 1996; TICE et al., 2000; WITTE et al., 2007; DHAWAN et al., 2008). Rydberg & Johanson (1978), foram os primeiros pesquisadores que quantificaram diretamente danos no DNA de células individuais ao lisarem as células embebidas em agarose em condições levemente alcalinas (CONTIJO; TICE, 2003; WITTE et al., 2007). O mecanismo principal, proposto por Östling e Johanson (1984), é que o DNA é organizado em grandes estruturas superenoveladas que, quando separadas por quebras na dupla-fita de DNA, podem migrar para o ânodo através da eletroforese. A aparência dos nucleóides submetidos ao teste levou Olive, em 1989, a sugerir o nome “Comet Assay” (TICE et al., 2000; KLAUDE et al., 1995; RIBEIRO; MARQUES, 2003; DHAWAN et al., 2008).

Mais tarde, Singh et al. (1988), apresentaram algumas modificações no protocolo do teste cometa, incluindo digestão proteica mais completa e eletroforese em pH alcalino (pH >13), o que tornaria a técnica mais sensível e a mais utilizada pelos pesquisadores da área (TICE et al., 2000). Nestas condições, a técnica permite detectar um mais amplo espectro de dano ao DNA - quebras de fita simples e dupla. O Ensaio Cometa tornou-se cada vez mais popular para mediar a dimensão e heterogeneidade dos danos causados por agentes genotóxicos em populações de células individuais. Para detectar o DNA, as lâminas são coradas e examinadas por microscopia de fluorescência. Diferentes técnicas para quantificar cometas têm sido relatadas, que vão desde a simples medição do comprimento da cauda a cálculos mais complexos (DURAND; OLIVE, 1997). A análise dos cometas gerados (tamanho, intensidade da fluorescência, aspecto e outras características) pode ser feita visualmente ou de maneira automatizada, com programas computacionais próprios, sendo bastante concordante os resultados fornecidos pelas duas formas de análise (TICE, 1995; COLLINS, 2004). Para interpretação dos resultados, o “cometa” é dividido entre cabeça e cauda. Assim células sem ou com pouco dano no DNA, não apresentariam cauda, enquanto células com mais danos apresentariam caudas maiores. Segundo Kobayashi e colaboradores (1995) os cometas são divididos em quatro classes, de acordo com a extensão do dano gerado:

- *cometa classe 0* – nucleóides que não apresentam cauda;

- *cometa classe 1* – nucleóides com cauda menor que o diâmetro do nucleóide;
- *cometa classe 2* – nucleóides com cauda de tamanho entre 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleóide;
- *cometa classe 3* – nucleóides com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucleóide.

A técnica do cometa avalia os danos no DNA de células individuais causados pela substância testada. Nesse teste, é verificada a corrida de fragmentos de DNA em relação ao núcleo principal, quando este é submetido a uma corrente em eletroforese, produzindo aspecto semelhante a um cometa; é um método rápido e sensível para a detecção de danos primários no DNA que tem sido amplamente utilizado na Genética Toxicológica por ser um teste relativamente simples, flexível, de rápidos resultados, onde um pequeno número de células por amostra e pequenas quantidades da substância teste são suficientes para conduzir um experimento (TICE et al., 2000).

Embora o teste seja amplamente aplicado, as técnicas de isolamento celular e as condições do experimento nas quais os testes são conduzidos, variam consideravelmente. Muitas variáveis técnicas podem afetar a sensibilidade do teste, tais como a natureza química e o mecanismo de ação do agente mutagênico, a concentração e quantidade de agarose de baixo ponto de fusão (LMP), a composição da solução de lise e tempo de lise, o tempo de desnaturação alcalina do DNA. Também são fatores que interferem nos resultados dos testes: composição e temperatura do tampão de eletroforese e as condições de corrida, coloração do DNA, entre outros (OLIVE et al., 1992; SPEIT et al., 1996).

Comparada com outras técnicas, o ensaio cometa apresenta algumas vantagens, dentre elas: (1) Apresenta sensibilidade em apontar baixo nível de danos no DNA; (2) Requerimento de baixo número de células por amostras; (3) Flexibilidade; (4) Baixo Custo; (5) Fácil aplicação; (6) Habilidade de conduzir estudos utilizando pequena quantidade de substância; e (7) Tempo relativamente curto para a realização de experimentos (Tice et al., 2000). Muitos autores têm utilizado a técnica do cometa em seus trabalhos para a avaliação de genotoxicidade (LEITE – SILVA, 2007; PEREIRA et al., 2008; ZOU et al., 2009; JIN et al., 2009; MCART et al., 2009; HOELZL et al., 2009; SEVERIN et al., 2010; ANGELI et al., 2010).

Além do seu amplo uso na investigação genotóxica *in vitro* e *in vivo*, biomonitoramento humano, epidemiologia molecular e ecogenotoxicologia, o ensaio cometa

constitui uma valiosa ferramenta para a investigação dos aspectos fundamentais de danos no DNA e seus mecanismos de reparo (COLLINS, 2004).

1.3.2 TESTE DO MICRONÚCLEO – MN

O Teste do Micronúcleo foi desenvolvido por Schmid et al. (1971), tendo sido melhorado alguns anos depois (SCHIMID, 1975). O ensaio foi desenvolvido primeiramente em sistema-teste *in vivo*, em células de medula óssea de camundongos, e posteriormente teve a versão *in vitro* introduzida por Heddle, em 1976. Atualmente é aplicado em vários tipos celulares, sendo muito utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal). O teste é amplamente recomendado para avaliação do potencial mutagênico, para o registro de novos produtos químicos que entram no mercado mundial (HAYASHI et al., 1994; CHOY, 2001; SBMCTA, 2005; OECD, 2007). O teste do micronúcleo é considerado um procedimento rápido, barato, que pode ser repetido várias vezes, para a prevenção e monitoramento de indivíduos sob risco carcinogênico, não necessitando, em alguns protocolos, do sacrifício do animal (HAYASHI et al., 1990; CARVALHO et al., 2002).

O micronúcleo constitui em uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal. Os micronúcleos são formados durante a telófase da mitose, quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. São resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Assim sendo, o micronúcleo representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou dano no aparelho mitótico (**Figura 2**).

É importante ressaltar que os micronúcleos são formados durante a mitose, independentemente do tipo de dano ocorrido durante o ciclo. Por isso, os danos no DNA causados, por exemplo, pela exposição a agentes mutagênicos, somente são expressos em micronúcleos após um ciclo de divisão celular, sendo dependentes da proporção de células que estão se dividindo. Conseqüentemente, a comparação da frequência de micronúcleos entre populações de células em divisão só seria segura quando a cinética de divisão nuclear após o dano ao DNA fosse idêntica (FENECH et al., 1999). Pensando nisso, Fenech e Moley

descreveram, em 1985, a versão do ensaio utilizando células binucleadas (MNCB), obtidas aplicando-se o bloqueio de citocinese, que permite identificar células que tenham passado por um ciclo de mitose após o tratamento. Isso possibilita identificar os micronúcleos gerados pela substância teste (aqueles em células binucleadas, pois obrigatoriamente passaram por um ciclo celular) e os ocasionados antes do tratamento (MN em células mononucleadas).

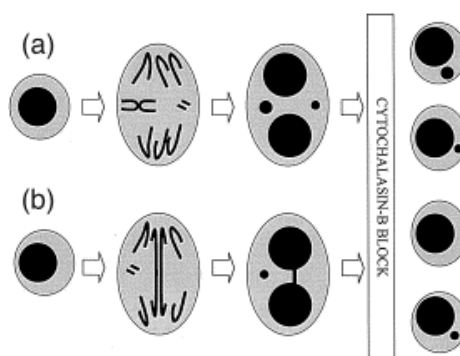


Figura 2 - A origem do micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro [a]; em [b], a formação de uma ponte citoplasmática e de um micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico. Extraído de Ribeiro & Marques (2003).

Os micronúcleos são resultantes de dois fenômenos básicos nas células mitóticas: quebra cromossômica e disfunção do aparato mitótico. São formados pelos cromossomos acêntricos ou fragmentos cromatídicos e cromossomos inteiros ou cromátides que se atrasam na anáfase e são excluídos do núcleo-filho na telófase. Sistemas *in vitro* podem ser realizados com diversas linhagens celulares e são eficientes para detectar efeitos clastogênicos e aneugênicos. Segundo Valentin-Severin (2003), uma substância micronúcleo positiva pode ser considerada mutagênica. A distinção do micronúcleo contendo cromossomos inteiros de um micronúcleo contendo fragmentos cromossômicos acêntricos pode ser feita utilizando-se hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de regiões pericentroméricas (MATEUCA et al., 2006).

Este teste foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos, mas é também realizado em ratos. A presença de (MN) é analisada em eritrócitos policromáticos (PCE, eritrócitos jovens) de medula óssea de camundongos, mas pode, também, ser analisada em eritrócitos normocromáticos (NCE, eritrócitos maduros). Os animais são expostos à substância teste pela via mais adequada e sacrificados em tempos

apropriados após o tratamento, para a coleta da medula óssea. As preparações celulares são coradas adequadamente (Giemsa ou Leishman) e analisadas para a presença de micronúcleos (RIBEIRO et al., 2010).

Para a análise, alguns aspectos envolvendo o micronúcleo devem ser observados, segundo Ferrari (1991), Titenko-Holland et al. (1997) e Fenech (2000):

- forma arredondada ou ovalada;
- cor e textura semelhantes à do núcleo principal;
- estar no mesmo plano e não estar ligado ao núcleo principal;
- tamanho entre 1/16 e 1/3 do tamanho do núcleo principal;
- não ser birrefringente.

O Teste do Micronúcleo (MN) é o ensaio mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos, sendo internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendados para avaliação do potencial mutagênico, para o registro de novos produtos químicos que entram no mercado mundial (CHOY, 2001). Muitos autores vêm utilizando o teste do micronúcleo *in vitro* e *in vivo* para avaliar o potencial mutagênico de determinadas substâncias (RESENDE, 2007; ZOU et al., 2009; SEVERIN et al., 2010; ANGELI et al., 2010; JIN et al., 2010).

O teste de micronúcleo é de extrema relevância para a Toxicologia Genética e Ambiental, tendo em vista que detecta mutações cromossômicas; considerando que este tipo de dano é encontrado em células de pacientes com câncer, o teste de micronúcleo pode ser considerado um possível indicador de susceptibilidade para a carcinogênese (BONASSI et al., 2003; BONASSI et al., 2007). A formação do micronúcleo é amplamente usada na epidemiologia molecular como um biomarcador de danos cromossômicos e instabilidade genômica (IARMARCOVAI et al., 2008).

1.4 APOPTOSE E DANOS CELULARES – Caspase 3 e SOD1

A apoptose é um programa de morte celular extremamente regulado e de grande eficiência, que requer a interação de inúmeros fatores. As alterações morfológicas observadas são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados (SARASTE & PULKKI, 2000). A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, organogênese e hematopoiese normal e patológica, na

reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (RANGANATH; NAGASHREE, 2001). Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas características desse tipo de morte celular, como retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos.

A demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular levou a uma intensa investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer (NICHOLSON, 2000).

Alguns genes estão envolvidos nos mecanismos de apoptose, seja como protetores ou como promotores (WU; XUE, 2003). A maioria dos estímulos desencadeiam a apoptose por ação das caspases, grupo de enzimas proteolíticas (*cysteinil aspartate specific proteases*) sintetizadas como pró-enzimas inativas. Dentre as 14 caspases humanas descritas até o momento, a caspase 3 faz parte do grupo de caspases envolvidas diretamente na apoptose, dentre o grupo das caspases efetoras (3, 6 e 7) (BOATRIGHT; SALVENSEN, 2003; MURPHY; MARTIN, 2003). O equilíbrio entre a cascata das caspases, indutoras da morte celular, e as proteínas inibidoras da apoptose, que inibem as caspases iniciadoras e efetoras, constituem ponto fundamental no processo apoptótico.

As caspases sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolípidios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997; BOATRIGHT; SALVENSEN, 2003).

O gene SOD1 fornece instruções para a produção de uma enzima denominada superóxido dismutase, que é abundante nas células. Esta enzima neutraliza moléculas super carregadas de oxigênio (radicais superóxido), que podem danificar as células se seus níveis não são controlados. Os radicais superóxido são subprodutos de processos celulares normais, especialmente das reações de produção de energia que ocorrem nas mitocôndrias. Para funcionar adequadamente, a enzima superóxido dismutase deve se ligar ao cobre e zinco (GENETICS HOME REFERENCE, 2007). Uma mutação de SOD1 pode resultar em deficiência da capacidade de neutralizar e, assim, levar a um desequilíbrio na homeostase e do excesso de radicais livres, deixando as células mais vulneráveis a ação de produtos tóxicos, principalmente os radicais livres (MIANA-MENA et al., 2010). Autores sugerem que a alteração desta enzima pode causar a morte de neurônios motores (KUNST, 2004; RAO;

WEISS, 2004; VALENTINI, 2005). Isso pode ser possível através de um acúmulo prejudicial de radicais superóxido, aumento da produção de outros tipos de radicais tóxicos, mitocôndrias anormais que não podem atender às demandas de alta energia dos neurônios motores, a promoção de morte celular (apoptose), a formação de grumos (agregados) de superóxido dismutase, que são tóxicos, ou a estimulação continuada de células nervosas (excitotoxicidade).

Quando os efeitos genotóxicos e citotóxicos são encontrados em células tratadas com determinadas substâncias é de fundamental importância que mecanismos moleculares de citotoxicidade sejam definidos para avaliar a segurança e uso efetivo desta classe de drogas na área estabelecida.

1.5 ARTEMISININA E ARTESUNATO

A malária é a endemia tropical mais devastadora no mundo, com 300 a 500 milhões de casos clínicos e quase três milhões de óbitos a cada ano, sendo a maioria destas mortes causada por infecção pelo *Plasmodium falciparum*, a mais nociva espécie de parasitas da malária (WHO, 2008). O princípio ativo da *Artemisia annua* ficou conhecido como artemisinina, sendo citada pelo *Chemical Abstracts* como “*artemisinin*” (KLAYMAN, 1985). Entre os quimioterápicos disponíveis para o tratamento e quimioprevenção da malária, a artemisinina merece destaque por ser o antimalárico cuja resistência dos plasmódios não possui relevância clínica (MESHNICK et al., 1996; DHIGRA et al., 2000; OLLIARO, 2001).

Em 1967, a República Popular da China iniciou um programa sistemático em busca de novos fármacos, empregando plantas nativas usadas como remédios em sua medicina tradicional (KLAYMAN, 1985). Uma dessas plantas, *Artemisia annua* L., já tinha uma longa história de uso. Conhecida como “qing hao” desde 168 a.C., foi usada inicialmente no tratamento de hemorróidas. As espécies *A. annua* L. e *A. apiacea* Hance apresentam um princípio ativo, denominado artemisinina, que foi identificada a partir de seu extrato etéreo e demonstrou atividade antimalárica durante testes farmacológicos (MESHNICK, 2002).

Em 1979, o *Qinghaosu Antimalaria Coordinating Research Group* descreveu que 2.099 casos de malária foram tratados com qinghaosu e todos os pacientes chegaram à cura clínica. Desses casos, 143 eram causados por parasitas resistentes à cloroquina e 141 eram casos de malária cerebral, para os quais o tratamento gerou bons resultados (KLAYMAN, 1985). A artemisinina possui ação rápida atuando contra *Plasmodium vivax* e *P. falciparum*,

inclusive sobre as formas de malária resistentes ao tratamento com cloroquinas e em casos de malária cerebral (KLAYMAN, 1985; RIDLEY, 2002). Da sua fonte natural, a *Artemisia annua*, a artemisinina pode ser obtida por extração (FRÉDERICH et al., 2002) das folhas e flores, com rendimento de 0,01-0,8% do peso seco (BALINT, 2001).

Amostras de Artemisinina têm sido quimicamente modificados para a produção de derivados, tais como: artesunato (*sodium artesunate*), artemether, arteether, dihidroartemisinina e ácido arteliníco (**Figura 3**). Estes compostos têm sido formulados para administração oral, retal e parenteral. Tem combinação potente, rápida atividade antimalárica com um amplo índice terapêutico e ausência de resistência clinicamente importante (WOODROW et al., 2005). O Artesunato é o mais versátil, sendo bastante solúvel em água, facilitando o desenvolvimento de formulações retal e oral, sendo bastante utilizado, tanto em monoterapias como em tratamentos combinados com outras drogas (WHO, 2001; ANGUS et al., 2002).

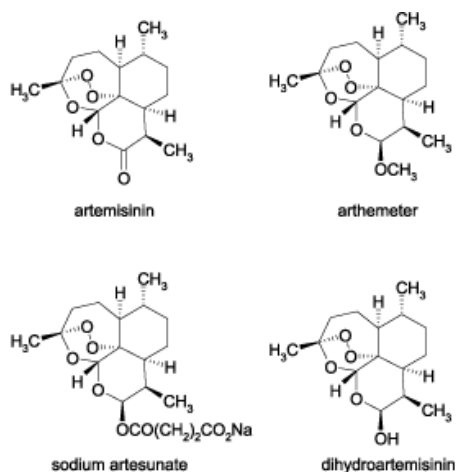


Figura 3 – Estrutura da Artemisinina e seus derivados (DELFINO et al., 2002).

A combinação do artesunato oral e mefloquine é bastante usada para o tratamento da malária no sudeste da Ásia. A adição de artesunato acelera a resposta terapêutica, reduz a taxa de recrudescência, reduz a transmitibilidade, previne o aparecimento de resistência, aumenta a complacência do paciente, e também fornece um tratamento que é altamente eficaz em pacientes hiperparasitêmicos e em infecções recrudescentes. (NOSTEN et al., 1994; LUXEMBURGUER et al., 1995; PRICE et al., 1995; NOSTEN et al., 2000). O artesunato

combinado com amodiaquine é uma ACT (Terapia Combinada a base de Artemisinina) recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) no uso de programas de controle da malária e primeira linha de tratamento para crianças africanas com malária não complicada (WHO, 2004).

Alguns trabalhos em relação ao artesunato verificaram o potencial genotóxico em células tumorais e células de roedores, *in vitro* (Efferth et al., 2003; Efferth et al., 2007; Hou et al., 2008; Paul et al., 2008; Cai et al., 2010; Chen et al., 2010; Du et al., 2010). Porém, *in vivo*, são poucos os trabalhos na literatura. Além disso, em relação à artemisinina, não há estudo publicado sobre seu potencial genotóxico/mutagênico sobre células HepG2, linhagem humana de hepatocarcinoma. Diante do uso recomendado da artemisinina e seus derivados, entre eles o artesunato, e da escassez de trabalhos referentes à toxicidade genética destas substâncias em células de mamíferos, principalmente *in vivo*, tornou-se necessário o estudo do comportamento destas substâncias em ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade, tais como o Teste de Micronúcleo e o Ensaio Cometa, que avaliam a segurança no uso em células humanas e também *in vivo*, com a utilização de camundongos.

2. OBJETIVO

O presente estudo teve por objetivo geral avaliar a capacidade de diferentes concentrações da artemisinina e do artesunato de induzir danos ao material genético, *in vivo* e *in vitro*, através da utilização do Ensaio Cometa e do Teste do Micronúcleo; e ainda avaliar se existe alteração na expressão dos genes envolvidos com o processo de apoptose (Casp 3) e neutralização de radicais superóxidos (SOD1), *in vitro*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a citotoxicidade da artemisinina e do artesunato em diferentes concentrações, em cultura de células HepG2, através de Teste com Rezasurina.

Investigar a indução de danos ao material genético em células HepG2 tratadas com as duas substâncias, através do Ensaio Cometa.

Avaliar a expressão dos genes Casp 3 e SOD1, em células HepG2 tratadas com artemisinina e artesunato, através da PCR em tempo real.

Investigar a indução de danos ao material genético em células de sangue periférico, fígado e medula de camundongos Suíços albinos, tratadas com artesunato, através do Ensaio Cometa e do Teste do Micronúcleo, *in vivo*.

3. REFERÊNCIAS

- AMES BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221(4617): 1256-1264, 1983.
- AMES BN, GOLD LS. Paracelsus to parascience: the environmental cancer distraction. *Mutation Research*, 447: 3-13, 2000.
- ANGELI JP, BARCELOS GR, SERPELONI JM, BARBOSA F JR, NERSESYAN A, MANTOVANI MS. Evaluation of the genotoxic and anti-genotoxic activities of Silybin in human hepatoma cells (HepG2). *Mutagenesis*, 25(3): 223–229, 2010.
- ANGUS BJ, THAIAPORN I, CHANTHAPADITH K, SUPUTTAMONGKOL Y, WHITE NJ. Oral Artesunate Dose-Response Relationship in Acute Falciparum Malaria. *Antimicrob Agents Chemother*, 46: 778-782, 2002.
- ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. **Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF**. Brasília, 2010.
- BALINT GA. Artemisinin and its derivatives. An important new class of antimalarial agents. *Pharmacol. Therapeut.*, 90: 261- 265, 2001.
- BARTSCH H, TOMATIS L. Comparison between carcinogenicity and mutagenicity based on chemicals evaluated in the IARC monographs. *Environmental Health Perspectives*, 47: 305-317, 1983.
- BAST A, CHANDLER RF, CHOY PC, DELMULLE LM, GRUENWALD J, HALKES SBA, KELLER K, KOEMAN JH, PETER P, PRZYREMBEL H, REE EM, RENWICK AG, VERMEER ITM. Botanical health products, positioning and requirements for effective and safe use. *Environ. Toxicol. Phar.*, 12: 195-211, 2002.
- BOATRIGHT KM, SALVESEN GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.*, 15: 725-31, 2003.
- BONASSI, S., NERI, M., LANDO, C., CEPPI, M., LIN, Y.P., CHANG, W.P., HOLLAND, N., KIRSCH-VOLDERS, M., ZEIGER, E., FENECH, M. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human Micronucleus Project. *Mutation Research*, 543: 155-166, 2003.

- BONASSI S, ZNAOR A, CEPPI M, LANDO C, CHANG WP, HOLLAND N, KIRSCH-VOLDERS M, ZEIGER E, BAN S, BARALE R, BIGATTI MP, BOLOGNESI C, CEBULSKA-WASILEWSKA A, FABIANOVA E, FUCIC A, HAGMAR L, JOKSIC G, MARTELLI A, MIGLIORE L, MIRKOVA E, SCARFI MR, ZIJNO A, NORPPA H, FENECH M. An increase micrnucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of câncer in humans. *Carcinogenesis Advance Access*, 28: 625-631, 2007.
- CAPASSO R, IZZO AA, PINTO L, BIFULCO T, VITOBELLO C, MASCOLO N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia*, 71: S58-S65, 2000.
- CARDOSO CRP. Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niedenzu e *Byrsonima intermedia* A.Juss. (Malpighiaceae). **Dissertação de Mestrado**. UNESP. Araraquara, 2006.
- CARVALHO MB, RAMIREZ A, GATTÁS GJF, GUEDES AL, AMAR A, RAPOPORT A, BARAÚNA NETO JC, CURIONI AO. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 48: 317-322, 2002.
- CHEN H, SHI L, YANG X, LI S, GUO X, PAN L. Artesunate inhibiting angiogenesis induced by human myeloma RPMI8226 cells. *Int. J. Hematol.* **92(4)**: 587-97, 2010.
- CHOY WN. Genotoxic and non-genotoxic mechanisms of carcinogenesis. In: Choy WN (Ed). *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment*. 1st edition. New York: MarcelDekker, 47-72, 2001.
- CNS – CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, **Resolução nº 251**, 07/08/1997. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/docs/Resolucoes/Reso251.doc>. Acesso em: 12 nov. 07.
- COLLINS A, DOBSON VL, DUSINKÁ M, KENNEDY G, STETINA R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*, 375: 183-193, 1996.
- COLLINS A. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 26: 249-261, 2004.
- CONTIJO AMMC, TICE R. Teste do cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO LR, SALVADORI DMF, MARQUES EK. **Mutagênese Ambiental**. 1ª ed. CANOAS: Editora da ULBRA, p.247-271, 2003.
- COSTA RJ. Avaliação *in vitro* do potencial mutagênico de *Bidens pilosa* Line (picão – preto) e de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) por meio de ensaio do cometa e teste de micronúcleo. **Dissertação de mestrado**. UEL. 2006.

- DE FLORA S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*, 402: 151-158, 1998.
- DELFINO RT, SANTOS-FILHO AO, FIGUEROA-VILLAR JD. Type 2 antifolates in the chemotherapy of falciparum malaria. *J. Braz. Chem. Soc.*, 13(6), 2002 .
- DHAWAN A, BAIPAYEE M, PARMAR D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*, 25: 5-32, 2008.
- DHINGRA VK, RAO V, NARASU LM. Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. *Life Sci.*, 66: 279-300, 2000.
- DOLL R, PETO R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl Cancer Inst.*, 66: 1191-1308, 1981. In: **Mutagênese Ambiental**, Capítulo 2, Ed. Ulbra, Canoas, 2003.
- DURAND RE, OLIVE PL. The comet assay: Alternatives for quantitative analyses. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 379: 130-131, 1997.
- DU JH, ZHANG HD, MA ZJ, JI KM. Artesunate induces oncosis-like cell death in vitro and has antitumor activity against pancreatic cancer xenografts in vivo. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 65: 895–902, 2010.
- EFFERTH T, GIAISI M, MERLING A, KRAMMER PH, WEBER ML. Artesunate induces ROS-mediated apoptosis in doxorubicin-resistant T leukemia cells. *PLoS One* 2(1): 693, 2007.
- EFFERTH T, SAUERBREY A, OLBRICH A, GEBHART E, RAUCH P, WEBER HO, HENGSTLER JG, HALATSCH ME, VOLM M, TEW KD, ROSS DD, FUNK JO. Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines. *Mol. Pharmacol.* 64:382–394, 2003.
- FENECH M, HOLLAND N, CHANG WP, ZEIGER E, BONASSI S. The Human Micronucleus Project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research*, 428: 271-283, 1999.
- FENECH M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455: 81 – 95, 2000.
- FERRARI I. Teste do micronúcleo em cultura temporária de linfócitos. In: RABELLO-GAY, MN, RODRIGUES MALR, MONELEONE-NETO R. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos de avaliação. **Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética**, 102 – 112, 1991

- FRÉDÉRICH M, DOGNÉ JM, ANGENOT L, DE MOL P. New Trendes in Anti-Malarial Agents. *Curr. Med. Chem.*, 9:1435-1456, 2002.
- GRIFFITHS AJF, GELBART WM, MILLER JH, LEWONTIN RC. **GENÉTICA MODERNA**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. p.380, 2001.
- HAYASHI M, MORITA T, KODAMA Y, SOFUNI T, ISHIDATE JR M. The micronucleus assay with mouse peripheral reticulocytes using acridina orange-coated slides. *Mutation Research*, 245: 245-249, 1990.
- HAYASHI M, TICE RR, MACGREGOR JT, ANDERSON D, BLAKEY DH, KIRSCH-VOLDERS M, OLESON JR. FB, PACCHIEROTTI F, ROMAGNA F, SHIMADA H, SUTOU S, VANNIER B. *In Vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. *Mutation Research*, 312: 293-304, 1994.
- HEDDLE JA. Mutagenicity: new horizons in genetic toxicology. *Academic Press*. New York, 1982.
- KHAN IA. IssueS related to botanicals. *Life Sciences*, 78: 2033-2038, 2006.
- HOELZL C, KNASMÜLLER S, MISÍK M, COLLINS A, DUSINSKÁ M, NERSESYAN A. Use of single cell gel electrophoresis assays for the detection of DNA-protective effects of dietary factors in humans: Recent results and trends. *Mutation Research*, 681: 68–79, 2009.
- 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*, 97(7): 1027-1031, 2002.
- IARMARCOVAI G, BONASSI S, BOTTA A, BAAN RA, ORSIÈRE T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutation Research*, 658: 215-233, 2008.
- JIN X, CHEN Q, TANG SS, ZOU JJ, CHEN KP, ZHANG T, XIAO XL. Investigation of quinocetone-induced genotoxicity in HepG2 cells using the comet assay, cytokinesis-block micronucleus test and RAPD analysis. *Toxicology in Vitro*, 23: 1209–1214, 2009.
- JUNQUEIRA, APF, PERAZZO, FF, SOUZA, GHB, MAISTRO, EL. Clastogenicity of Piper cubeba (Piperaceae) seed extract in an in vivo mammalian cell system. *Genetics and Molecular Biology*, 30(3):656-663, 2007.
- KLAYMAN DL. Qinghaosu (Artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, 228: 1049-1055, 1985.

- KLAUDE M, ERIKSSON S, NYGREN J, AHNSTRÖM, G. The comet assay: Mechanisms and technical considerations. *Mutation Research*, 363: 89-96, 1996.
- KOBAYASHI H, SUGIYAMA C, MORIKAWA Y, HAYASHI M, SOFUNI T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun*, 3: 103-115, 1995.
- KRICHER JC. The neotropical pharmacy. In: A neotropical companion. An introduction to animals, plants and ecosystems of the New World tropics. 2nd ed. New Jersey, *Princeton University Press*, p.144-168, 1997.
- KUNST CB. Complex genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet*. 75(6): 933-47, 2004.
- LEITE-SILVA C, GUSMÃO CLS, TAKAHASHI CS. Genotoxic and antigenotoxic effects of *Fucus vesiculosus* extract on cultured human lymphocytes using the chromosome aberration and Comet assays. *Genet. Mol. Biol.*, 30(1), 2007.
- LEWIN B (Ed) *Genes VII*. USA: Oxford University Press, 2000. In: NEGRAES PD. Mutagenicidade e Antimutagenicidade da Clorofilina – Uma avaliação do seu mecanismo de ação in vitro. **Dissertação de Mestrado**. UEL. Londrina: 2003.
- LUXEMBURGUER C, NOSTEN F, RAIMOND SD, CHONGSUPHAJAISIDDHI T, WHITE NJ. Oral artesunate in the treatment of uncomplicated hyperparasitemic falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 53: 522-525, 1995.
- MACIEL MAM, PINTO AC, VEIGA JRVF. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, 25(3): 429-438 2002.
- MALUF SW, ERDTMANN B. Biomonitorização do dano genético em humanos. **Genética Toxicológica**. Ed: SILVA J, ERDTMANN B, HENRIQUES JAP. Editora Alcance, pp. 183-205, Porto Alegre: 2003.
- 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. *Mutation Research*, 536: 117-120, 2003.
- MATEUCA R, LOMBAERT N, AKA PV, DECORDIER I, KIRSCH-VOLDERS M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88: 1515-1531, 2006.
- MCART DG, MCKERR G, HOWARD CV, SAETZLER K, WASSON GR. Modelling the comet assay. *Biochemical Society Transactions* , v. 37, part 4, 2009.

- MESHNICK SR, TAYLOR TE, KAMCHONWONGPAISAN S. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiol. Rev.*, 60: 301-315, 1996.
- MESHNICK SR. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int. J. Parasitol.*, 32: 1655-1660, 2002.
- MIANA-MENA FJ, GONZÁLEZ-MINGOT C, LARRODE P, MUNÓZ MJ, OLIVÁN S, FUENTES-BROTO L, MARTÍNEZ-BALLARÍN E, REITER RJ, OSTA R, GARCÍA JJ. Monitoring systemic oxidative stress in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* Published online: 25 november 2010.
- MURPHY BM, MARTIN S.J. Caspases in "Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research". *The Humana Press Inc.* Cap 1. p. 135-144, 2003.
- MULLER WU, STREFFER C. Micronucleus assay, in: G. Obe (Ed.) Springer, New York. Advances in *Mutagenesis Research*, 5: 1–134, 1994.
- NEGRAES PD. Mutagenicidade e antimutagenicidade da Clorofilina – Uma avaliação do seu mecanismo de ação in vitro. *Dissertação de Mestrado*. UEL. 2003.
- NICHOLSON DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature*. 07: 810-16, 2000.
- NICHOLSON DW, THORNBERRY NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.*, 22: 299-306, 1997.
- NOSTEN F, LUXEMBURGUER C, TER KUILE FO, WOODROW C, EH JP, CHONGSUPHAJAISIDDHI T, WHITE NJ. Treatment of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria with 3-day artesunate-mefloquine combination. *J. Infect. Dis.*, 170: 971-977, 1994.
- NOSTEN F, VAN YUGT M, PRICE RN, LUXEMBURGUER C, THWAY KL, BROCKMAN A, MCGREADYR, TER KUILE FO, LOOAREESUWAN S, WHITE NJ. Effects of artesunate-mefloquine combination on incidence of *Plasmodium falciparum* malaria and mefloquine resistance in western Thailand: a prospective study. *The Lancet*, 356: 297-302, 2000.
- NTP. Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of ethylbenzene (Cas No. 100-41-4) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies). **NATIONAL TOXICOLOGICAL PROGRAM**. NTP TR 466, 1999. In: Vieira PM. Estudo do potencial mutagênico e antimutagênico da *Solanum paniculatum* L. pelo teste do micronúcleo em camundongos. *Dissertação de Mestrado*. UFG. 2008.

- NUSSBAUM RL, MCINNES RR, WILLARD HF. Thompson E Thompson Genética Médica. Ed. Guanabara Koogan, 6ª ed, 2006.
- OECD - **GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS**. DRAFT PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test (mnvit), 2007. Disponível em: < <http://www.oecd.org/dataoecd/38/58/39780112.doc> > Acesso em: 07 set. 2007.
- OLIVE PL, WLODEK D, DURAND RE, BANNÉTH P. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel eletrophoresis. **Exper. Cell Res.**, 198: 259 – 267, 1992.
- OLLIARO P. Mode Of Action And Mechanism Of Resistance For Antimalarial Drug. **Pharmacol. Therap.**, 89: 207-219, 2001.
- ÖSTLING O, JOHANSON KJ. Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 123: 291-298, 1984.
- PACHECO ABF, KRÜGER WMV, FERREIRA LCS. **Apostila Mutagênese**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2009.
- PEREIRA AD, ANDRADE SF, SWERTS MSO, MAISTRO EL. First in vivo evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, 46: 2580-2584, 2008.
- PINTO LFR, FELZENSZWALB I. Genética do câncer humano. In: **Mutagênese Ambiental**, Capítulo 2, Ed. Ulbra, Canoas, 2003.
- PRESTON RJ, DEAN BJ, GALLOWAY S, HOLDEN H, MCFEE AF, SHELBY M. Mammalian in vivo cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. **Mutation Research.**, 189: 157-165, 1987.
- PRICE RN, NOSTEN F, LUXEMBURGUER C, KHAM A, BROCKMAN A, CHONGSUPHAJAISIDDHI T, WHITE NJ. Artesunate versus artemether in combination with mefloquine for the treatment of multidrug-resistant falciparum malaria. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, 89: 523-527, 1995.
- RAO SD, WEISS JH. Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis. **Trends Neurosci.**, 27(1):17-23, 2004.
- RANGANATH RM, NAGASHREE NR. Role of programmed cell death in development. **Int Rev Cytol.**, 202: 159-242, 2001.

- REIFFERSCHIED G, HEIL J. Validation of SOS/*umu* test using results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data. *Mutation Research*, 369: 129-145, 1996.
- RESENDE FA, ALVES JM, MUNARI CC, SENEDESE JM, SOUSA JP, BASTOS JK, TAVARES DC. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. *Mutation Research*, 634(1-2): 112-8. 2007.
- RIBEIRO LR, SALVADORI DMF, MARQUES EK (Organizadores). **Mutagênese Ambiental**. Ed. Ulbra, Canoas, 2003.
- RIBEIRO LR, SALVADORI DMF, TAKAHASHI CS, GRISÓLIA CC. Teste do micronúcleo em eritrócito de medula óssea de camundongo. SBMCTA. **Orientações básicas para a execução de testes de mutagenicidade para a proteção da saúde humana e do meio ambiente**. Disponível em: <http://www.sbmcta.org.br/serie-documentos.pdf>. Acesso em: 22/06/2010.
- RIDLEY RG. *Nature*, 415, 686, 2002.
- SARASIN A. An overview of the mechanisms of mutagens and carcinogens. *Mutation Research*, 544: 99-106, 2003.
- SARASTE A, PULKKI K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.*, 45: 528-37, 2000.
- SBMCTA, série documentos. Orientações básicas de execução de testes de mutagenicidade para proteção da saúde humana e do meio ambiente. **Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental**. 2005. Disponível em: <<http://www.sbmcta.org.br/index.php?arq=doc01>>. Acesso em: jun. 2008.
- SCCNFP – THE SCIENTIFIC COMMITTEE ON COSMETIC PRODUCTS AND NON-FOOD PRODUCTS INTENDED FOR CONSUMERS. **Proposal for recommended mutagenicity/genotoxicity tests for the safety testing of cosmetic ingredients to be included in the annexes to Council Directive 76/768/EEC**. 2003.
- SCHMID W. The micronucleus test. *Mutation Research*, 31: 9-15, 1975.
- SEVERIN I, DUMONT C, JONDEAU-CABATON A, GRAILLOT V, CHAGNON MC. Genotoxic activities of the food contaminant 5-hydroxymethylfurfural using different in vitro bioassays. *Toxicology Letters*, 192: 189–194, 2010.
- SINGH NP, MCCOY MT, TICE RR, SCHNEIDER EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175: 184-191, 1988.

- TICE RR, AGURELL E, ANDERSON D, BURLINSON B, HARTMANN A, KOBAYASHI H, MIYAMAE Y, ROJAS E, RYU JC, SASAKI YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* **35**: 206-221, 2000.
- TITENKO-HOLLAND N, WINDHAM G, KOLACHANA P, REINISCH F, PARVATHAM S, OSORIO AM, SMITH MT. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleous assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers. *Mutation Research*, **338**: 85 – 95, 1997.
- TRICHOPOULOU A, KATSOUYANNI K, STUVER S, TZALA L, GNARDELLIS C, RIMM E, TRICHOPOULOS D. Consumption of olive oil and specific food groups in relation to breast cancer risk in Greece. *J Natl Cancer Inst*, **87**: 110-116, 1995.
- VALENTINE JS, DOUCETTE PA, ZITTIN PS. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annu Rev Biochem.*, **74**: 563-93, 2005.
- VALENTIN-SEVERIN I, LE HEGARAT L, LHUGUENOT JC, LE BON AM, CHAGNON MC. Use of HepG2 cell line for direct and indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutation Research*, **536**: 79-90, 2003.
- VARELLA SD, POZETTI GL, VILEGAS W, VARANDA EA. Mutagenic activity of sweepings and pigments of a household-was factory assayed with *Salmonella typhimurium*. *Food and Chemical Toxicol.*, **42**: 2029-2035, 2004.
- WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Handbook: Good Laboratory Practice (GLP). Quality practices for regulated non-clinical research and development. 2001.** Disponível em: <<http://apps.who.int/tdr/publications/training-guideline-publications/good-laboratory-practicehandbook/pdf/glp-handbook.pdf>>. Acesso em: 10 mai. 2009.
- WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Handbook – Non Clinical Safety Testing.** 2004. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/publications/safety-handbook.htm>. Acesso em: 03 nov. 2009.
- WHO/WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Malaria.** 2001. Disponível em: <http://www.rbm.who.int/cmc_upload/0/000/015/367/RBMInfosheet_6.htm>. Acesso em: jun. 2008.
- WITTE I, PLAPPERT U, WALL H, HARTMANN A. Genetic Toxicity Assessment: Employing the best science for human evaluation Part III: The Comet Assay as an

- alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection. *Toxicological Sciences*, 97(1): 21-26, 2007.
- WOODROW CJ, HAYNES RK, KRISHNA S. Artemisininins. *Postgrad Med J*, 81: 71-78, 2005.
- WU YC, XUE D. Programmed cell death in *C. elegans*. "Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research". *The Humana Press Inc*. Cap. 4, p. 135-144, 2003.
- ZAHA A. (Coord.). **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, p.336, 1996.
- In: VIEIRA PM. Estudo do potencial mutagênico e antimutagênico da *Solanum paniculatum* L. pelo teste do micronúcleo em camundongos. Dissertação de Mestrado. UFG. 2008.
- ZEIGER E. What is needed for an acceptable antimutagenicity manuscript. *Mutation Research*, 626: 1-3, 2007.
- ZOU J, CHEN Q, TANG S, JIN X, CHEN K, ZHANG T, XIAO X. Olaquinox-induced genotoxicity and oxidative DNA damage in human hepatoma G2 (HepG2) cells. *Mutation Research*, 676: 27-33, 2009.

4. ARTIGO 1

Submetido ao *Journal of Applied Toxicology*

Genotoxicity assessment of the antimalaric compound artesunate in somatic cells of mice.

Ivani Aquino^a, Fábio Ferreira Perazzo^b and Edson Luis Maistro^{c*}

^a Universidade Estadual Paulista – UNESP – Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Botucatu, SP, Brazil. 18618-970.

^b Universidade Federal de São Paulo – Unifesp, Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Diadema, SP, Brazil, 09972-270.

^c Universidade Estadual Paulista – UNESP – Faculdade de Filosofia e Ciências, Departamento de Fonoaudiologia. Marília, SP, Brazil. 17525-900.

Autor Correspondente: E. L. Maistro.

Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Filosofia e Ciências, Departamento de Fonoaudiologia. Av. Hygino Muzzi Filho, 737, Caixa Postal 181. Marília, SP. CEP 17525-900.

E-mail: edson.maistro@marilia.unesp.br

ABSTRACT: Artesunate is a derivate of artemisinin that is both an antimalarial agent and acts cytotoxically on tumor cells. Despite its therapeutic use, its *in vivo* genotoxic potential has still not been evaluated. This study, therefore, was an investigation into the effects of a single oral administration of artesunate with an *in vivo* comet assay that analyzed leukocytes from peripheral blood and liver cells and a micronucleus (MN) assay of bone marrow cells from male Swiss mice. The doses of artesunate were administered by oral gavage at doses of 5, 50, 100 and 2000 mg/kg. Cytotoxicity was assessed by scoring 200 consecutive polychromatic (PCE) and normochromatic (NCE) erythrocytes (PCE/NCE ratio). The results demonstrate that high doses of artesunate caused an increase in the mean number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) and that the highest dose induced significant DNA damage, especially in liver cells. Under our experimental conditions, artesunate showed weak genotoxic effects at low doses, high genotoxicity after metabolism at 2000 mg/kg dose, and clastogenic effects at high doses. The PCE/NCE ratio indicated cytotoxicity only at the 2000 mg/kg dose. The data suggest caution about either continuous or high-dose use of artesunate by humans.

Keywords: Artesunate, Artemisinin derivate, micronucleus test, comet assay, clastogenicity.

INTRODUCTION

Malaria is the most devastating endemic tropical disease in the world, with between 300 and 500 million clinical cases and almost three million deaths every year. Most of these deaths are caused by infection with *Plasmodium falciparum*, the most harmful species of malaria parasite (WHO, 2008). The main active principle of the *Artemisia annua* plant is known as artemisinin (Klayman, 1985). Artemisinin and its derivatives, such as artesunate, stand out among the chemotherapy medicine available for the treatment and chemoprophylaxis of malaria because this anti-malarial medicine presents no clinically relevant resistance to plasmodium (Meshnick *et al.*, 1996; Dhigra *et al.*, 2000; Olliaro, 2001). Artemisinin has been chemically modified to produce derivatives such as: sodium artesunate, artemether, arteether, dihydroartemisinin, and artelinic acid. These compounds have been formulated for oral, rectal, and parenteral administration. Combinations of these medicines have presented fast antimalarial activity and an absence of clinically important resistance (Woodrow *et al.*, 2005). Artesunate is the most versatile of these derivatives, because it is easily soluble in water, which has facilitated the development of oral and rectal formulas, and thus is often used both in monotherapy and combined with other drugs (WHO, 2001; Angus *et al.*, 2002).

The combination of oral artesunate and mefloquine is commonly used to treat malaria in Southeast Asia. The addition of artesunate accelerates the therapeutic response, reduces recrudescence rates and transmissibility, prevents the occurrence of resistance, increases patient compliance, and also provides a highly effective treatment for hyperparasitemic patients and recrudescence infections. (Nosten *et al.*, 1994; Luxemburguer *et al.*, 1995; Price *et al.*, 1995; Nosten *et al.*, 2000).

The combination of artesunate and amodiaquine is an ACT (artemisinin-based combination therapy) recommended by the World Health Organization (WHO) for use in malaria control programs, and is a first-line treatment for African children with non-complicated malaria (WHO, 2004).

Considering the use of artesunate in the treatment of malaria and the inexistence of *in vivo* mammal cell studies investigating its genetic toxicity, the main objective of this study was to evaluate the genotoxic/mutagenic potential of artesunate in the peripheral blood cells, liver and bone marrow of male albino (*Mus musculus*) Swiss mice, using the Comet assay (SCGE) and the micronucleus test.

MATERIALS AND METHODS

Artesunate

Dihydroartemisinin was prepared from artemisinin using a routine procedure (Brossi *et al.*, 1988). The acid chloride RCOCl was prepared from the corresponding carboxylic acids by heating them with thionyl chloride at 50–60°C for 2–3 h and reacting them with dihydroartemisinin in the presence of triethylamine in dry dichloromethane at 0 °C for 2 h to furnish ester derivatives in 49–58% yields. Artesunate was prepared from dihydroartemisinin (DHA) by reacting it with succinic acid anhydride in basic medium. Pyridine was used as a solvent, sodium bicarbonate as a base and DMAP (*N,N*-dimethylaminopyridine) and triethylamine in 1,2-dichloroethane were used as catalysts, with yields of up to 100%. The mixture was stirred up to 9 h to obtain artesunate in quantitative yield. The product was

further re-crystallized from dichloromethane. Alpha-Artesunate was exclusively formed (m.p 135–137°C).

Chemicals

Doxorubicin (DXR, Oncodox®, Meizler) was used as the DNA damaging agent in the comet and micronucleus assays, and was prepared by dissolving in sterile water. The other main chemicals were obtained from the following suppliers: normal melting point (NMP) agarose (Cat. No. 15510-019: Invitrogen) low melting point (LMP) agarose (Cat. No. 15517-014: Invitrogen), sodium salt *N*-lauroyl sarcosine (L-5125: Sigma) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Merck).

Animals and dosing

Experiments were carried out on 12-week old male Swiss albino mice (*Mus musculus*), weighing 25-30 g. The animals were acquired from the animal house of the Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil and kept in polyethylene boxes ($n = 6$) in a climate-controlled environment ($25 \pm 4^{\circ}\text{C}$, $55 \pm 5\%$ humidity) with a 12h light/dark cycle (7 a.m. to 7 p.m.). Food (NUVILAB CR1 – NUVITAL) and water were available *ad libitum*. The mice were divided into experimental groups of six animals. Artesunate was diluted in water and administered in a single dose of 0.5 mL by gavage at concentrations of 5, 50, 100 and 2000 mg/kg body weight. These concentrations were based on our acute toxicity studies in mice, which used doses above 2000 mg/kg, as well as on studies of its antimalarial effects (Angus *et al.*, 2002). The negative control group received distilled water. The positive

control group received an intraperitoneal injection of Doxorubicin 80 mg/kg. The animals used in this study were sacrificed by cervical dislocation. The experimental design is presented in Table 1. The Animal Bioethics Committee of FAMEMA, Marília, Brazil, approved this study on July 30, 2009 (protocol number 140/09), in accordance with federal government legislation on animal care.

Comet assay

The Comet assay (SCGE) was carried out according to the method described by Speit and Hartmann (1999), which is based on the original work of Singh *et al.* (1988), and the guidelines discussed by Tice *et al.* (2000), as well as additional modifications. Twenty-four hours after the treatment, peripheral blood leukocytes from six Swiss mice from each group were sampled. A 10 μ L aliquot of cells from each animal was mixed with 120 μ L of 0.5% low melting point agarose at 37°C, and rapidly spread onto microscope slides pre-coated with 1.5% normal melting point agarose. Coverslips were added and the slides were allowed to gel at 4°C for 20 min. The coverslips were gently removed and the slides were then immersed in cold, freshly prepared lysing solution consisting of 89 mL of a stock solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH set to 10.0 with ~8g solid NaOH, 890 mL of distilled water and 1% sodium lauryl sarcosine), plus 1 mL of Triton X-100 (Merck) and 10 mL of dimethylsulfoxid (Merck). The slides, which were protected from light, were kept at 4°C for 1 h and then placed in the gel box, positioned at the anode end, and immersed in a high pH (>13) electrophoresis buffer (300 mM NaOH per 1 mM EDTA, prepared from a stock solution of 10 N NaOH and 200 mM, pH 10.0, EDTA) at 4°C for 20 min prior to electrophoresis in order to allow the DNA to unwind. The electrophoresis run was carried out

in an ice bath (4°C) for 20 min at 300 mA and 25 V (0.722 V cm⁻¹). The slides were then submerged in a neutralization buffer (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) for 15 min, dried at room temperature and fixed in 100% ethyl alcohol for 10 min. The slides were dried and stored overnight or longer before staining. For the staining process, each slide was briefly rinsed in distilled water, covered with 30 µL of 1x ethidium bromide staining solution prepared from a 10x stock (200µg/ml) and covered with a coverslip. The material was evaluated immediately at 400x magnification, using a fluorescence microscope (Olympus BX 50) with a 515-560 nm excitation filter and a 590 nm barrier filter.

The extent and distribution of DNA damage indicated by the SCGE assay was evaluated by examining at least 100 randomly selected and non-overlapping cells (50 cells per coded slide) per animal in a blind analysis (six mice per group). These cells were scored visually, according to tail size, into the following four classes: class 0- no tail; class 1- tail shorter than the diameter of the head (nucleus); class 2- tail length 1 to 2 times the diameter of the head; and class 3- tail length more than twice the diameter of the head. Comets with no heads, with nearly all of the DNA in the tail or with a very wide tail were excluded from the evaluation because they probably represented dead cells (Hartmann and Speit, 1997). The total score for 100 comets, which ranged from 0 (all undamaged) to 300 (all maximally damaged), was obtained by multiplying the number of cells in each class by the damage class.

Micronucleus assay

The assay was carried out following standard protocols, as recommended by Schmid (1975) and Krishna and Hayashi (2000). The same six mice per group used in the Comet assay were used in the micronucleus test. Animals were sacrificed 24 h after the treatment. The bone

marrow from both femurs was flushed out using 2 mL of saline solution (NaCl 0.9%) and centrifuged for 7 min. The supernatant was discarded and smears were made. The slides were coded for a “blind” analysis, fixed with methanol and stained with Giemsa solution. For the micronucleated cell analysis, 2,000 polychromatic erythrocytes (PCE) per animal were scored to determine the mutagenic effects of artesunate. To detect possible cytotoxic effects, the PCE/NCE (polychromatic/normochromatic erythrocyte) ratio from 200 erythrocytes/animal was calculated (Gollapudi and McFadden, 1995). Coded slides were scored with a light microscope at 1000x magnification. The mean number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) in individual mice was used as the experimental unit, with variability (standard deviation) based on intragroup differences among animals.

Statistical Analysis

After verifying for normal distribution, the data obtained from micronucleus and SCGE assays were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA) and the Tukey-Kramer multiple comparison test (Sokal and Rohlf, 1995) with the GraphPad Instat[®] software (version 3.01). The results were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

The comet assay results are shown in Tables 1 and 2, where the animals results for the different doses of artesunate and DXR-positive control are compared with the negative control (water). As expected, when the positive control was compared with the negative

control, we found that DXR induced a significant increase ($P < 0.001$ or greater) in comet assay DNA migration for leukocyte and liver cells (Tables 1, 2). We found a significant increase in DNA migration only at a 2000 mg/kg dose of artesunate in both leukocytes and liver cells and at a 5 mg/kg dose in liver cells. There was no statistical difference in DNA migration between the three tested doses of artesunate. At the dosage that induced a significant increase in DNA damage in leukocyte cells, most of the damage was minor (class 1), with only a very few cells showing a large amount of damage (classes 2 and 3). However, in liver cells, the 2000 mg/kg dose induced a great increase in DNA damage, with half of all cells showing a large amount of damage (classes 2 and 3).

Table 3 shows the micronucleus test results obtained for male Swiss mice treated with artesunate: the mean number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) in untreated controls and treated animals. As expected, the positive mutagen DXR induced a statistically significant increase in MNPCE. The clastogenicity test revealed an increase in the mean number of MNPCE at all tested doses, being statistically significant at the three highest doses. The observed clastogenicity was not dose-related. The tested substance caused a statistically significant decrease in PCE/NCE ratios only at 2000 mg/kg dose. These data suggest that artesunate had a weak clastogenic effect on the bone marrow cells of mice and cytotoxic effects when administered at high doses.

DISCUSSION

Before the approval of new pharmaceutical products, either natural or synthetic, both their therapeutic and their toxicological effects must be evaluated, so that only substances free from potential mutagenic effects are introduced (Rodeiro *et al.*, 2006). Several studies have

suggested that mutagenic agents produce carcinogenic effects (Chandra *et al.*, 2006). The combined use of the Comet Assay and micronucleus test in a single study has yielded good results. Vasquez (2010), using the damage-inducing agents Mitomycin C and Cyclophosphamide, tested both techniques concomitantly on different tissues of rats and mice, and thus reduced the number of animals used without compromising the efficacy of the test.

Through the Comet assay, it is possible to quantify and distinguish different DNA damage levels, seeing that the evaluation of scores for each experimental group is highly important. In this study, artesunate induced DNA damage in the peripheral blood cells of animals treated with the highest dose (2000 mg/kg) ($p < 0.001$). However, for the 5 mg/kg, 50 mg/kg and 100 mg/kg doses, the observed DNA damage was significantly lower than that observed in the negative control group. In liver cells, the 5 mg/kg, 50 mg/kg and 2000 mg/kg doses were genotoxic; the 100mg/kg dose also increased the total number of damaged cells, but this increase was not statistically significant. Among the damaged nucleoids, class 1 comets were predominant except in the liver cells of animals treated with the 2000mg/kg dose, where class 1 and 2 damage prevailed. However, in the group treated with doxorubicin, class 2 and 3 comets predominated. Thus, low doses of artesunate presented low genotoxicity, but at high doses and after being metabolized by the liver, it presented high genotoxicity.

Li *et al.* (2008) analyzed CHO-9 (Chinese hamster ovary cell line) cells and V79-2 (hamster lung fibroblast cell line) cells with the Comet assay and verified that, *in vitro*, artesunate induced DNA damage and apoptosis. These authors also concluded that, in mammal cells, artesunate generated damage through direct or indirect oxidative stress, resulting in DNA strand breakage. The present study confirms such results *in vivo* and suggests that the generation of reactive oxygen species could be involved in the genotoxicity of artesunate.

Damage to the DNA molecule, such as adducts and breakage of single or double strands, could become permanent lesions, and the micronucleus test is an excellent means of investigating this type of damage in genetic material (Serpeloni et al., 2008). Furthermore, the micronucleus test can detect cytotoxic effects with the PCE/NCE ratio. When the normal proliferation of bone marrow cells is affected by a cytotoxic agent, there is a reduction in the number of immature erythrocytes (PCE) compared to the number of mature erythrocytes (NCE), thus reducing the PCE/NCE ratio (Gollapudi and McFadden, 1995). At the 2000 mg/kg dose, the PCE/NCE ratio observed in liver cells was 0.67 ± 0.04 ($p < 0.001$), even lower than the Doxorubicin positive control, which presented a ratio of 0.98 ± 0.04 . This means that, at the highest tested dose, artesunate affected the normal proliferation of erythrocytes in bone marrow, which represents a cytotoxic effect. Considering that the micronucleus appears in cells only after cell division, it is probable that, at the highest tested dose, artesunate prevented cell division, and thus no evidence of micronucleated daughter cells could be observed.

The frequency of micronucleated cells was analyzed after 24h of treatment. This treatment time was determined according to recommendations in the literature, having taken into account the kinetics of micronucleus formation and cell division (Chaubey *et al.*, 1993; Vikram, Ramarao & Jena, 2007). The results indicated that the positive control (Doxorubicin) caused a significant increase ($p < 0.001$) in the number of micronucleated cells compared to the negative control, thus confirming the sensitivity of the test. In the groups treated with artesunate at doses of 50 mg/kg, 100mg/kg and 2000mg/kg, there was a statistically significant increase in micronucleated polychromatic erythrocytes compared to controls ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively). This means that, under our experimental conditions, artesunate presented clastogenic/aneugenic activity at the three highest doses tested.

Furthermore, at the 2000 mg/kg dose, the animals presented clinical signs of toxicity, such as trembling, ruffled hair and apathy.

Generally speaking, antineoplastic drugs are cytotoxic, and some studies suggest that the cytotoxic activity of artesunate may be effective against cancer by causing damage to cancer cells, delaying the cellular cycle, inhibiting the proliferation of solid tumors, or even inducing apoptosis (Efferth *et al.*, 2003; Efferth *et al.*, 2007; Hou *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2010). Nevertheless, it is necessary to rigorously investigate their safety, given that artesunate presented genotoxic and clastogenic/aneugenic activity in the present study, which might invalidate its use for treating both malaria and cancer.

In conclusion, the results indicate that artesunate presents cytotoxic effects at the highest tested dose, as well as clastogenic/aneugenic activity in young bone marrow erythrocytes. And although artesunate induced only mild DNA damage in cells that do not metabolize peripheral blood, at high doses it caused severe DNA damage in cells that do, such as those in the liver.

Acknowledgements

Research supported by the Brazilian agencies CNPq (306544/2006-7) and FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2008/51175-7). We thank Patrícia C. Martins Mello for her technical assistance.

REFERENCES

- Angus BJ, Thaiaporn I, Chanthapadith K, Suputtamongkol Y, White NJ. 2002. Oral Artesunate Dose-Response Relationship in Acute Falciparum Malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 778-782.
- Brossi A, Venugopalan B, Dominguez G L, Yeh H J C, Flippen-Anderson J L, Buchs P, Luo X- D, Milhous W and Peters W.1988. Arteether, a new antimalarial drug: Synthesis and antimalarial properties. *J. Med. Chem.* **31**: 645.
- Cai X, You P, Cai J, Yang X, Chen Q, Huang F. 2011. ART-induced biophysical and biochemical alterations of Jurkat cell membrane. *Micron* **42**(1): 17-28.
- Chandra S, Chauhan LKS, Dhawan A, Murthy RC, Gupta SK. 2006. In vivo genotoxic effects of industrial waste leachates in mice following oral exposure. *Environ. Mol.r Mutag.* **47**: 325-333.
- Chaubey RC, Bhilwade HN, Joshi BN, Chauhan PS. 1993. Studies on the migration of micronucleated erythrocytes from bone marrow to peripheral blood in irradiated Swiss mice. *Int. J. Radiat. Biol.* **63**: 239–245.
- Chen H, Shi L, Yang X, Li S, Guo X, Pan L. 2010. Artesunate inhibiting angiogenesis induced by human myeloma RPMI8226 cells. *Int. J. Hematol.* **92**(4): 587-97.
- Dhingra VK, Rao V, Narasu LM. 2000. Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. *Life Sci.* **66**: 279-300.
- Du JH, Zhang HD, Ma ZJ, Ji KM. 2010. Artesunate induces oncosis-like cell death in vitro and has antitumor activity against pancreatic cancer xenografts in vivo. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **65**: 895–902.

- Efferth T, Giaisi M, Merling A, Krammer PH, Weber ML. 2007. Artesunate induces ROS-mediated apoptosis in doxorubicin-resistant T leukemia cells. *PLoS One* **2(1)**: 693.
- Efferth T, Sauerbrey A, Olbrich A, Gebhart E, Rauch P, Weber HO, Hengstler JG, Halatsch ME, Volm M, Tew KD, Ross DD, Funk JO. (2003) Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines. *Mol. Pharmacol.* **64**:382–394.
- Gollapudi BB, McFadden LG. 1995. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erithrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mut. Res.* **347**: 97-99.
- Hartmann A, Speit G. 1997. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol. Lett.* **90**: 183-188.
- Hou J, Wang D, Zhang R, Wang H. 2008. Experimental therapy of hepatoma with artemisinin and its derivatives: in vitro and in vivo activity, chemosensitization, and mechanisms of action. *Clin. Cancer Res.* **14(17)**: 5519–5530.
- Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G. 1996. The comet assay: Mechanisms and technical considerations. *Mut. Res.* **363**: 89-96.
- Klayman DL. 1985. Qinghaosu (Artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* **228**: 1049-1055.
- Kobayashi H, Sugiyama C, Morikawa Y, Hayashi M, Sofuni T. 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun.* **3**: 103-115.
- Li PC, Lam E, Roos WP, Zdzienicka MZ, Kaina B, Efferth T. 2008. Artesunate derived from traditional chinese medicine induces dna damage and repair. *Cancer Res.* **68(11)**: 4347-51.

- Luxemburguer C, Nosten F, Raimond SD, Chongsuphajasiddhi T, White NJ. 1995. Oral artesunate in the treatment of uncomplicated hyperparasitemic falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**: 522-525.
- Meshnick SR, Taylor TE, Kamchonwongpaisan S. 1996. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiol. Rev.* **60**: 301-315.
- Nosten F, Luxemburguer C, Ter Kuile Fo, Woodrow C, EH JP, Chongsuphajasiddhi T, White NJ. 1994. Treatment of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria with 3-day artesunate-mefloquine combination. *J. Infect. Dis.* **170**: 971-977.
- Nosten F, Van Yugt M, Price RN, Luxemburguer C, Thway KL, Brockman A, McGreadyr, Ter Kuile Fo, Looareesuwan S, White NJ. 2000. Effects of artesunate-mefloquine combination on incidence of *Plasmodium falciparum* malaria and mefloquine resistance in western Thailand: a prospective study. *The Lancet* **356**: 297-302.
- Olliaro P. 2001. Mode of action and mechanism of resistance for antimalarial drug. *Pharmacol. Therap.* **89**: 207-219.
- Price RN, Nosten F, Luxemburguer C, Kham A, Brockman A, Chongsuphajasiddhi T, White NJ. 1995. Artesunate versus artemether in combination with mefloquine for the treatment of multidrug-resistant falciparum malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**: 523-527.
- Rodeiro I, Cancino L, Gonza'lez JE, Morffi J, Garrido G, Gonza'lez RM, Nuñez A, Delgado R. 2006. Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity. *Food Chem. Toxicol.* **44**: 1707-1713.
- Serpeloni JM, Reis MB, Rodrigues J, Santos LC, Vilegas W, Varanda EA, Dokkedal AL, Colus IM. 2008. In vivo assessment of DNA damage and protective effects of extracts

- from *Miconia* species using the comet assay and micronucleus test. *Mutagenesis* **23(6)**: 501–507.
- Schmid W. 1975. The micronucleus test. *Mut. Res.* **31**: 9-15.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**: 184-191.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. Rohlf. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3^a ed. W. H. Freeman and Co.
- Speit G, Hartmann A. 1999. *The Comet Assay (Single-Cell Gel Test)*. In: Methods in Molecular Biology, DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems (Henderson DS, ed.). Humana Press Inc., Totowa, **113**: 203-212.
- Speit G, Hartmann A. 2005. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol. Biol.* **29**: 85-95.
- 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.
- Vasquez MZ. 2010. Combining the in vivo comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. *Mutagenesis* **25(2)**: 187–199.
- Vikram A, Ramarao P, Jena G. 2007. Prior bleeding enhances the sensitivity of peripheral blood and bone marrow micronucleus tests in rats. *Mutagenesis* **22**: 287–291.
- WHO: World Health Organization. 2001. Handbook: Good Laboratory Practice (GLP). Quality practices for regulated non-clinical research and development. Disponível em: <http://apps.who.int/tdr/publications/training-guideline-publications/good-laboratory-practicehandbook/pdf/glp-handbook.pdf>. Acesso em: 10 mai. 2009.

WHO: World Health Organization. 2004. Handbook – Non Clinical Safety Testing.

Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/publications/safety-handbook.htm>.

Acesso em: 03 nov. 2009.

WHO: World Health Organization. 2001. *Malaria*. Disponível em: http://www.rbm.who.int/cmc_upload/0/000/015/367/RBMInfosheet_6.htm.

Acesso em: jun. 2008.

Woodrow CJ, Haynes RK, Krishna S. 2005. Artemisinins. *Postgrad. Med. J.* **81**: 71-78.

Zambrano MA, Targa HJ, Rabello-Gay MN. 1982. Physiological saline solutions as a useful

tool in micronucleous and metaphase slide preparations. *Stain Techn.* **57**: 48-49.

Table 1 – DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of Artesunate in peripheral blood cells (collected 24 h after the treatment) from swiss mice male (M) *in vivo*.

Treatments		Comet class					Scores
	Animals	Total ¹	0	1	2	3	
Control	M ₁	11	89	11	0	0	11
	M ₂	9	91	9	0	0	9
	M ₃	8	92	8	0	0	8
	M ₄	9	91	9	0	0	9
	M ₅	11	89	11	0	0	11
	M ₆	12	88	12	0	0	12
		10 ± 1,54					10 ± 1,54
Artesunate (5 mg/kg)	M ₁	1	99	1	0	0	1
	M ₂	3	97	3	0	0	3
	M ₃	6	94	6	0	0	6
	M ₄	8	92	7	1	0	9
	M ₅	4	96	4	0	0	4
	M ₆	6	94	6	0	0	6
		4,66 ± 2,50					4,83 ± 2,78
Artesunate (50 mg/kg)	M ₁	5	95	4	1	0	6
	M ₂	6	94	4	2	0	8
	M ₃	4	96	3	1	0	5
	M ₄	1	99	1	0	0	1
	M ₅	4	96	4	0	0	4
	M ₆	2	98	2	0	0	2
		3,66 ± 1,86					4,33 ± 2,58
Artesunate (100 mg/kg)	M ₁	5	94	3	2	0	7
	M ₂	2	98	2	0	0	2
	M ₃	5	95	4	1	0	6
	M ₄	4	96	4	0	0	4
	M ₅	1	99	1	0	0	1
	M ₆	3	97	3	0	0	3
		3,33 ± 1,63					3,83 ± 2,31
Artesunate (2000 mg/kg)	M ₁	26	74	26	0	0	26
	M ₂	21	79	19	2	0	23
	M ₃	19	81	19	0	0	19
	M ₄	22	78	21	1	0	23
	M ₅	26	74	24	2	0	28
	M ₆	27	73	24	3	0	30
		23,5 ± 3,27*					24,83 ± 3,97*
Doxorubicin (80 mg/kg)	M ₁	97	3	36	39	22	180
	M ₂	98	2	42	40	16	170
	M ₃	98	2	33	34	31	194
	M ₄	100	0	45	35	20	175
	M ₅	100	0	48	44	8	160
	M ₆	100	0	51	32	17	166
	Mean ±	98,8 ± 1,32*					174,1 ± 11,9*

* Significantly different from the negative control (P<0.001); ¹Total number of cells with damage (class 1+2+3).

Table 2 – DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of Artesunate in liver cells (collected 24 h after the treatment) from swiss mice male (M) *in vivo*.

Treatments		Animals	Total ¹	Comet class				Scores
				0	1	2	3	
Control	M ₁		6	94	6	0	0	6
	M ₂		9	91	9	0	0	9
	M ₃		9	91	8	1	0	10
	M ₄		10	90	9	1	0	11
	M ₅		7	93	5	2	0	9
	M ₆		4	96	4	0	0	4
			7,5 ± 2,25	±	±	±	±	8,16 ± 2,63
Artesunate (5 mg/kg)	M ₁		16	84	16	0	0	16
	M ₂		18	82	16	2	0	20
	M ₃		21	79	21	0	0	21
	M ₄		17	83	17	0	0	17
	M ₅		17	83	12	5	0	22
	M ₆		16	84	16	0	0	16
			17,5 ± 1,87***	±	±	±	±	18,6 ± 2,65**
Artesunate (50 mg/kg)	M ₁		8	92	8	0	0	8
	M ₂		18	82	18	0	0	18
	M ₃		11	89	11	0	0	11
	M ₄		16	84	16	0	0	16
	M ₅		17	83	17	0	0	17
	M ₆		15	85	13	2	0	17
			14,1 ± 3,86*	±	±	±	±	14,5 ± 4,03
Artesunate (100 mg/kg)	M ₁		9	91	9	0	0	9
	M ₂		6	94	6	0	0	6
	M ₃		20	80	18	2	0	22
	M ₄		11	89	6	5	0	16
	M ₅		7	93	7	0	0	7
	M ₆		16	84	14	2	0	18
			11,5 ± 5,46	±	±	±	±	13 ± 6,57
Artesunate (2000 mg/kg)	M ₁		99	1	51	44	4	151
	M ₂		99	1	49	46	4	153
	M ₃		97	3	56	41	0	138
	M ₄		96	4	50	44	2	144
	M ₅		97	3	48	47	2	148
	M ₆		98	2	53	42	3	146
			97,6 ± 1,21***	±	±	±	±	146,6 ± 5,35 ***
Doxorrubicin (80 mg/kg)	M ₁		96	4	42	39	15	165
	M ₂		98	2	43	38	15	164
	M ₃		96	4	45	39	12	159
	M ₄		97	3	46	34	17	165
	M ₅		95	5	42	32	21	169
	M ₆		98	2	43	38	17	170
			Mean ± SD	96,6 ± 1,21***	±	±	±	165,3 ± 3,93***

*Significantly different from the negative control (P<0.05);

**Significantly different from the negative control (P<0.01);

***Significantly different from the negative control (P<0.001); ¹Total number of cells with damage (class 1+2+3).

Table 3 - Number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) observed in the bone marrow cells of male (M) Swiss mice treated with Artesunate, and respective controls. Two thousand cells were analyzed. SDM = standard deviation of the mean.

Treatments	Number of MNPCE per Animal						MNPCE Mean $\pm$ SD	PCE/NCE Mean $\pm$ SD
	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆		
Negative control (water)	3	3	3	2	2	1	2,33 $\pm$ 0,81	1,10 $\pm$ 0,02
Artesunate (5 mg/kg)	2	1	3	4	3	3	2,66 $\pm$ 1,03	1,07 $\pm$ 0,03
Artesunate (50 mg/kg)	8	5	4	5	8	7	6,16 $\pm$ 1,72**	1,08 $\pm$ 0,03
Artesunate (100 mg/kg)	6	8	9	7	6	9	7,5 $\pm$ 1,37**	1,1 $\pm$ 0,04
Artesunate (2000 mg/kg)	6	4	4	5	3	5	4,5 $\pm$ 1,04*	0,67 $\pm$ 0,04 **
Doxorubicin (80 mg/kg)	83	83	82	83	81	82	82,3 $\pm$ 0,81**	0,98 $\pm$ 0,04**

*

Significantly different from negative control ($p < 0.05$).

** Significantly different from negative control ($p < 0.001$).

5. Artigo 2

A ser submetido à *Toxicology in vitro*

Expressão de SOD1 e Caspase 3 e efeito genotóxico em células HepG2 tratadas com artemisinina e artesunato

Ivani Aquino^a, Marcela Stefanini F. Tsuboy^b, Juliana Cristiana Marcarini^b, Mário Sérgio Mantovani^c, Fábio Ferreira Perazzo^d and Edson Luis Maistro^{e*}

Affiliation

^a Universidade Estadual Paulista – UNESP – Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Botucatu, SP, Brazil. 18618-970.

^b Universidade Estadual Paulista – UNESP – Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular), Rio Claro, SP, Brazil. 13506-900.

^c Universidade Estadual de Londrina – UEL – Laboratório de Genética Toxicológica, Londrina, PR, Brazil, 86061-990.

^d Universidade Federal de São Paulo – Unifesp, Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Diadema, SP, Brazil, 09972-270.

^e Universidade Estadual Paulista – UNESP – Faculdade de Filosofia e Ciências, Departamento de Fonoaudiologia. Marília, SP, Brazil. 17525-900.

*** Corresponding author:** E. L. Maistro, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Filosofia e Ciências, Departamento de Fonoaudiologia. Av. Hygino Muzzi Filho, 737, Caixa Postal 181. Marília, SP, Brazil. 17525-900. E-mail address: edson.maistro@marilia.unesp.br. Phone: + 551434021324. Fax: + 551434021302

Resumo

O tratamento para combater a Malária recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é feito com medicamentos derivados da artemisinina, tais como o artesunato, o princípio ativo extraído da *Artemisia annua* L.). Com base nesta informação, este trabalho teve por objetivo avaliar a citotoxicidade, o potencial genotóxico e a expressão dos genes *SOD1* e *CASP3*, em células HepG2 (*Human hepatocellular liver carcinoma cell line*) tratadas com a artemisinina (ATM) e o artesunato (ART). Foram testadas as concentrações de 2,5, 5, 7,5, 10 e 20 µg/mL, de ambas as substâncias, no teste de citotoxicidade com Resazurina, com base em dados da literatura. Através deste teste, determinou-se as concentrações utilizadas nos experimentos de genotoxicidade (2,5, 5 e 10 µg/mL), e análise de expressão gênica (5 µg/mL). Os resultados do ensaio cometa com a ATM e o ART mostraram um aumento significativo ($p < 0,001$) no número de células com danos no DNA, em relação ao controle negativo, em todas as concentrações avaliadas, o que indica um efeito genotóxico destas substâncias. Já na análise da expressão gênica, houve um aumento na expressão de *CASP3*, nas células tratadas com as duas substâncias. Em relação à expressão do gene *SOD1*, houve um aumento na expressão de mRNA em células tratadas com ATM, enquanto nas células tratadas com o ART, houve uma diminuição na expressão deste gene. Apesar da análise da expressão gênica não ter atingido significância estatística na concentração de ATM e ART estudadas, as análises ajudaram a entender um pouco do mecanismo de ação destas substâncias. Frente aos dados obtidos conclui-se que tanto a ATM quanto o ART apresentaram efeito genotóxico e alteraram a expressão de mRNA da caspase 3, proteína efetora na cascata apoptótica, podendo indicar que em concentrações maiores, a citotoxicidade encontrada pode ser devida a elevados danos no DNA que por sua vez, desencadeiam a via de apoptose.

Palavras-chave: Artemisinina, artesunato, HepG2, expressão gênica, Ensaio Cometa.

1. Introdução

A artemisinina (ATM), uma lactona sesquiterpênica isolada da planta *Artemisia annua*, é uma droga amplamente utilizada para tratar cepas resistentes da malária (Efferth et al., 2007). Esta substância e seus compostos derivados fazem parte de todas as cinco terapias de combinação à base de artemisinina (ACTs) recomendadas pela OMS para o tratamento da malária falciparum não complicada (WHO, 2010). Diversos trabalhos *in vitro*, utilizando linhagens celulares tumorais, sugerem que estas substâncias apresentam efeitos citotóxicos, alteram o ciclo celular e induzem à apoptose (Hou et al., 2008; Li et al., 2008; Youns et al., 2009; Du et al., 2010; Zhang et al., 2010).

Uma edição do “*Guidelines for Carcinogen Risk Assessment*” publicada pela EPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) aponta as alterações na expressão gênica, reparo do DNA, controle do ciclo celular, instabilidade genômica e danos cromossômicos como as principais conseqüências da exposição aos agentes ambientais e eventos críticos envolvidos no processo da carcinogênese (U.S. EPA, 2005; Preston, 2007). Dentre as metodologias utilizadas para a detecção destes danos, estão o Ensaio Cometa e a análise da expressão gênica.

Pesquisas recentes indicam que o mecanismo de ação dos antimaláricos, tais como artemisinina e seus derivados, geram danos na estrutura das membranas, que podem influenciar diretamente na função normal da célula, o que propicia o início de uma série de reações bioquímicas e, finalmente, morte celular (Olliaro and Taylor, 2004; Voïtchovsky et al., 2006; Sato et al., 2007). Essas drogas são amplamente utilizadas, com mais de 100 milhões de doses ministradas anualmente (WHO, 2004), apesar de terem sido relatados casos de embriotoxicidade em ratos e coelhos (Clark et al., 2004; Longo et al., 2006) e neurotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (Brewer et al., 1994; Schmuck et al., 2002). Artemisininas e seus derivados podem apresentar atividade citotóxica na proliferação das células de mamíferos (Efferth et al., 2001; Posner et al., 2003; Jeyadevan et al., 2004; Disbrow et al., 2005), e sugere-se que a toxicidade está relacionada com a alta concentração intracelular de ferro (Lai and Singh, 1995; Smith et al., 1997; Singh and Lai, 2001).

Além disso, foi demonstrado que endoperóxidos de ATM desencadeiam a produção de espécies reativas de oxigênio, que também têm sido implicados no mecanismo de ação citotóxica (Disbrow et al., 2005). É essencial que o potencial genotóxico

e mecanismos moleculares de citotoxicidade sejam determinados para avaliar a segurança e uso efetivo desta classe de drogas na área estabelecida de malária e seu uso potencial no tratamento de câncer.

Neste estudo, investigamos a citotoxicidade, o potencial genotóxico da artemisinina (ATM) e do artesunato (ART), através do Ensaio Cometa (SCGE) e as atividades de expressão dos genes *SOD1* e *CASP3* sobre células HepG2 tratadas com estas substâncias.

2. Material e Métodos

2.1. Artemisinina e Artesunato

As folhas de *Artemisia annua* L. – 39 x 5 - foram coletadas no campo experimental de plantas medicinais do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) – UNICAMP - na cidade de Paulínia, interior do estado de São Paulo. Uma exsicata está depositada no herbário do CPQBA (CPQBA 12.46). Folhas (5000 g) de *A. annua* foram secas em estufa a 40 °C, trituradas e extraídas por maceração com hexano por dois dias (20,0 l). O macerado foi filtrado acrescido de concentrado sob pressão reduzida, fornecendo 92g do extrato bruto hexânico (rendimento 1,84%). A purificação de artemisinina foi conduzida em colunas cromatográficas utilizando sílica gel 60 230 – 400 mesh (partículas de 0,040 - 0,063 mm). A eluição dos componentes da amostra foi feita incorporando o material com uma mistura de hexano:acetato de etila (9:1). Foi utilizada a mesma fase móvel para correr a coluna e as sucessivas frações obtidas monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD). Após purificação da amostra, foi realizada a cristalização da artemisinina com solventes selecionados (Rimada et al., 2009). Cristais incolores, com aspecto típico de agulhas longas foram obtidos no total de 16,4g de artemisinina (rendimento de 0,33%). A análise foi confirmada por Ressonância magnética Nuclear foi obtido. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em aparelho Bruker DPX 400 MHz, operando em 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C . As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3 , Aldrich Co.).

Diidroartemisinina foi preparada a partir de artemisinina utilizando o procedimento descrito por Brossi et al.(1988). Os cloretos de acila RCOCl foram preparados a partir dos

ácidos carboxílicos correspondentes por aquecimento com cloreto de tionila a 50-60 ° C por 2-3 horas e reagiram com diidroartemisina na presença de trietilamina em diclorometano seco a 0 ° C por 2 horas para fornecer ésteres em 49-58% de rendimento. O artesunato foi preparado a partir da diidroartemisina (DHA) por reação com anidrido de ácido succínico em meio básico. A piridina foi utilizada como solvente, bicarbonato de sódio como base e catalisador de DMPA (N, N-dimetilaminopiridina) e trietilamina em 1,2-dicloroetano, com rendimentos de até 100%. A mistura foi agitada até 9 horas para o artesunato com rendimento quantitativo. O produto foi novamente re-cristalizado a partir de diclorometano. Foi formado exclusivamente Alpha-Artesunate (m.p. 135-137 ° C).

2.2. Linhagem Celular

A linhagem celular utilizada foi a HepG2, obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil. Para os experimentos, as células foram mantidas em meio de cultura MEM - *Minimum Essential Medium* (Gibco), com antibiótico e antimicótico (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco).

As células foram cultivadas em monocamada de 10 mL de meio de cultura utilizando-se frascos estéreis descartáveis de 25 cm² de área (Corning) a 37° C em estufa de CO₂.

2.3. Determinação das concentrações utilizadas e Ensaio de Citotoxicidade com Resazurina

Desde 1995 estudos vêm sendo realizados com a utilização de resazurina, como indicador de crescimento celular (Yajko et al., 1995). Testamos as concentrações 2,5; 5; 7,5; 10; e 20 µg/mL, com base na literatura disponível. Estes testes foram feitos em duplicata biológica, com três réplicas cada. Para cada repetição, utilizamos uma microplaca de cultivo celular de 24 poços, semeada com 5x10⁴ células por poço, por 24 horas. Após este período, foram realizados o tratamentos com as concentrações de artemisinina e artesunato descritas acima, bem como o controle positivo (Doxorrubicina 2 µg/mL) e controle negativo (Meio + DMSO 1%). Após 24 horas de tratamento, o meio com tratamento foi descartado, cada poço foi lavado com PBS e adicionamos 750µL de solução de resazurina 60µM em cada poço,

protegido da luz. Incubamos por mais 3 horas, a 37°C, 5% CO₂. Após este período, sempre protegida da luz, a placa foi levada para leitura em espectrofotômetro de fluorescência (Victor 3, Perkin-Elmer®), na faixa de 530-560 nm de excitação e 580-600nm de emissão.

2.4. Ensaio Cometa

O teste do Cometa foi realizado de acordo com as premissas de Tice et al., 2000. Foram semeadas 10⁶ células por frasco experimental e, após 24 horas de estabilização, as células foram tratadas com ATM e ART, nas concentrações 2,5, 5 e 10 µg/mL, por 3 horas. Após este período, as células foram tripsinizadas (500 µL de tripsina-EDTA 0,1%; 37°C), a suspensão celular centrifugada (5 minutos, 1000 rpm) e ressuspendida em 500 µL de meio de cultura. Em seguida, foi adicionado 120 µL de agarose baixo ponto de fusão (LMP – 0,5%), sendo este material depositado em lâminas pré-gelatinizadas (agarose de ponto de fusão normal; 1,5%) e levadas para solução de lise por pelo menos 1h. Após desnaturação (20 minutos) e eletroforese alcalinas (25 V, 300 mA, 20 minutos), as lâminas foram neutralizadas, fixadas e mantidas sob refrigeração até o momento da análise. A coloração das lâminas foi feita com brometo de etídeo e a análise visual (Kobayashi, 1995) em microscopia de fluorescência (filtro de excitação de 420-490 nm e filtro de barreira de 520 nm) e aumento de 400x. Os cometas foram classificados em: *classe 0* – nucleóides que não apresentam cauda; *classe 1* – nucleóides com cauda menor que o diâmetro do nucleóide; *classe 2* – nucleóides com cauda de tamanho entre 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleóide; *classe 3* – nucleóides com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucleóide. Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo analisadas 300 células por tratamento. A análise da viabilidade celular foi realizada pelo método de exclusão por azul de trypan, sendo considerados somente os tratamentos com índice superior a 80%.

2.5. Análise da expressão gênica por qRT-PCR em tempo real

Para análise da expressão gênica, foram semeadas 10⁶ células por frasco experimental e, após 24 horas de estabilização, as células foram tratadas com ATM e ART, na concentração de 5 µg/mL, por 12 horas. Os experimentos foram realizados em duplicatas.

A extração do RNA foi feita com TRIZOL LS (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A avaliação da integridade do RNA foi feita por eletroforese em gel de agarose 1% (visualização do padrão de bandas dos RNAr 18S e 28S) e por quantificação em espectrofotômetro (razão A_{260}/A_{280}). Após a verificação da integridade do RNA, foi realizada a síntese do cDNA. Para tanto, utilizou-se 2µL de DNTP (Invitrogen – 10mM), 1µL de oligo(dT) (10pmol/ µL), 500ng de RNA genômico e completou-se o volume de 14,9µL com água DEPC. Incubou-se por 5 minutos, no termociclador (TECHNE® TC 412), a 65°C. Transferiu-se rapidamente para o gelo e, em seguida, acrescentou-se 4µL de tampão Mlv 5x (Invitrogen), 0,1µL inibidor de ribonuclease (RNase out – Invitrogen) e 1µL de transcriptase reversa (M-Mlv-RT –Invitrogen). Desta forma, totalizou-se o volume final de 20µL. Incubou-se em termociclador a 37°C, por 50 minutos. O cDNA foi acondicionado em freezer -80°C até a realização dos experimentos de PCR em tempo real.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em sistema de detecção de fluorescência *MJ Research DNA Engine Opticon* (BIO-RAD) utilizando o corante SYBR Green (Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG - Invitrogen) As condições da PCR foram as seguintes: desnaturação do cDNA a 50°C por 1 min, seguido de 95° por 3 minutos, 35 ciclos a 95°C por 20 segundos; anelamento do *primer* 60°C por 30 segundos; e extensão a 72°C por 20 segundos, seguidos de 95°C por 10 seg. e 40°C por 1 min. A análise da curva de *melting* foi realizada no final da reação com temperatura de 50°C até 95°C a cada 0,5°C por 5 seg. Os dados foram normalizados com *primer* de gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (*GAPDH*, de acordo com Sugaya et al., 2005) amplificados em cada conjunto de experimentos de PCR. A sequência do *primer SOD1* foi construída de acordo com Ding et al. (2004) e a sequência do *primer CASP3* foi construída através do programa disponível no site do fornecedor (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>), sendo Forward 5'-GTGCTACAATGCCCCCTGGAT-3' e Reverso 5'- GCCCATTCATTTATTGCTTTCC-3'.

2.6. Análise Estatística

Os resultados do Teste de Citotoxicidade e do Ensaio Cometa foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas (Sokal e Rohlf, 1995), usando o software GraphPad Software InStat ® (versão 3.01). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos em $P < 0,05$. Já os níveis de expressão dos

genes em estudo resultantes da qRT-PCR foram determinados pelo método de Pfaffl et al. (2001), com análise estatística realizada através do Software REST-384 (Pfaffl et al., 2002).

3. Resultados

3.1. Ensaio de Citotoxicidade (Resazurina)

Os resultados do teste com resazurina realizados em duplicata indicaram que as concentrações 7,5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ foram citotóxicas (**Fig. 1**). Desse modo, escolhemos com base nestes dados as concentrações de 2,5, 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ para a realização do Ensaio Cometa e a concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ para a análise de expressão gênica.

3.2. Ensaio Cometa

Nas condições do nosso experimento, em todas as 3 concentrações (2,5; 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) tanto os grupos tratados com Artemisinina quanto os com Artesunato tiveram aumento no número de células com danos no DNA, bem como seus respectivos *scores*, com $p < 0,001$, em relação ao controle negativo (**tabela 1**). A maioria das células que sofreram danos no DNA mostraram danos pequenos e médios (classes 1 e 2), e uma minoria das células apresentaram grande quantidade de danos (classe 3). A artemisinina, de um modo geral, apresentou um número maior de células com danos médios (classe 2) em relação ao tratamento com o artesunato.

3.3. Análise molecular

Na análise da expressão gênica, todos os grupos mantiveram a integridade do RNA, com quantidade e pureza satisfatórios. Através da qRT-PCR, pudemos observar se houve modificação na expressão de alguns genes de interesse. O gene Caspase 3 teve um pequeno aumento de expressão em relação ao controle. Porém, quando analisamos a expressão do

gene SOD1, verificamos que nas células tratadas com Artemisinina houve um aumento da expressão, enquanto o mesmo não ocorreu nas células tratadas com Artesunato, onde houve uma diminuição de sua expressão. As diferenças observadas não foram estatisticamente significativas. Estes resultados estão expressos na **figura 2**.

4. Discussão

Muitos medicamentos e fatores ambientais podem danificar DNA, e experimentos que visam compreender o resultado da exposição aos agentes prejudiciais ao DNA são de fundamental importância no desenvolvimento de medicamentos e na pesquisa em saúde ambiental. No caso da artemisinina e do artesunato, o equilíbrio entre os efeitos terapêuticos e os efeitos toxicológicos é necessário para verificar a segurança no uso destas substâncias.

Para determinar as concentrações utilizadas foi realizado o ensaio de citotoxicidade com resazurina. Este teste é usado para determinar a citotoxicidade de substâncias e é um dos métodos mais empregados e mais sensíveis para detecção de citotoxicidade *in vitro* (Fotakis and Timbrell, 2006). Uma das vantagens desse ensaio é que ele não avalia apenas a morte celular, mas também pode indicar a inibição de crescimento celular, ou seja, o efeito citostático. Tratando células HepG2 com artemisinina e diidroartemisinina (1-100 Amol/L), Hou e colaboradores (2008) observaram uma redução significativa na viabilidade celular, através do teste de MTT, com a porcentagem de células viáveis variando de 84,7% para 15,5% ($P < 0,01$) após uma exposição de 48 h. Ainda neste trabalho, o tratamento de células HepG2 com ATM resultou em um maior número de células na fase G1 nas concentrações utilizadas [10 Amol / L (67,41%), 25 Amol / L (70,72%), e 50 Amol / L (69,21%)], respectivamente, em comparação com células não tratadas (Hou et al., 2008). Nossos resultados mostram que concentrações 2,5 e 5 µg/mL de ATM e ART não apresentaram efeito citotóxico em células HepG 2 após 24 horas de tratamento. De acordo com esses dados foi realizado o ensaio do cometa para verificar se essas concentrações causam lesões no DNA.

No presente trabalho, tanto a artemisinina quanto o artesunato induziram a danos no DNA, que foram quantificados através do Ensaio Cometa, que determina as quebras de fita simples ou dupla da molécula de DNA. Nossos resultados mostram que tanto os grupos tratados com artemisinina quanto artesunato, nas 3 concentrações testadas, apresentaram

lesões no material genético ($p < 0,001$). Nas células tratadas com Doxorubicina (controle positivo) houve uma predominância de danos no DNA das classes 2 e 3, resultado similar ao encontrado em nosso experimento *in vivo* (*dados não mostrados*). Nas células tratadas com artemisinina e artesunato, os nucleóides danificados tiveram predominância de cometas de classes 1 e 2. Li et al. (2008), utilizando células CHO-9 (*Chinese hamster ovary cell line*) e V79-2 (*hamster lung fibroblast cell line*), verificaram através do Ensaio Cometa que, *in vitro*, o artesunato induzia danos no DNA e também à apoptose. Eles concluíram ainda que, em células de mamíferos, o artesunato gerava esses danos através de estresse oxidativo, direta ou indiretamente, o que resultava nas quebras de fitas do DNA. Esses dados semelhantes aos obtidos em nossos experimentos em células HepG2 tratadas com artesunato, além do tratamento da artemisinina, já que ambas as substâncias, em todas as concentrações testadas, induziram a lesões no DNA ($p < 0,001$). Du e colaboradores (2010), testando o artesunato em células pancreáticas tumorais Panc-1 e CFPAC-1, observaram, por intermédio de microscopia eletrônica, destruição das organelas celulares, incluindo a mitocôndria, sugerindo que a citotoxicidade do artesunato envolve alteração na função normal da mitocôndria. Além da indução de danos no DNA, a citotoxicidade destas substâncias, especialmente o artesunato é, em parte, devido a diminuição da expressão da Topoisomerase 2 (*Top2A*) (Youns et al., 2009). A *Top2A* é essencial para a proliferação celular e está expressa em células em divisão (Toyoda et al., 2008).

A apoptose ou morte celular programada é um regulador chave do controle de crescimento fisiológico e regulação da homeostase dos tecidos. A morte de células tumorais por meios utilizados atualmente em Oncologia Clínica, como a quimioterapia ou imunoterapia, tem sido associada à ativação das vias de apoptose de transdução de sinal em células cancerosas.

Hou et al., 2008; Li et al., 2008; Youns et al., 2009; Du et al., 2010; Zhang et al., 2010, utilizando linhagens celulares tumorais, sugerem que a artemisinina e o artesunato apresentam efeitos citotóxicos, alteram o ciclo celular e induzem à apoptose. Em vista disso, analisamos a expressão gênica da caspase 3, uma vez que é a via final comum de quase todas as vias apoptóticas. Tanto no grupo tratado com artemisinina, quanto no grupo tratado com artesunato houve um leve aumento na expressão desse gene, embora não significativo, o que pode sugerir que ambas as substâncias alteram o ciclo celular, porém não induziram a apoptose. Essa expressão não significativa de caspase 3 também pode ser devido ao tempo de exposição das células à essas substâncias (12h). Youns et al. (2009) observou indução da

caspace 3 em seus experimentos com artesunato, porém as células foram tratadas somente por 6 horas.

Devido à relação da artemisinina e artesunato com a indução de estresse oxidativo (Michaelis et al., 2010), optou-se por estudar a expressão gênica de Cu/Zn superóxido desmutase (*SOD1*). Nossos resultados mostram que o grupo de células tratadas com artemisinina teve a expressão de *SOD1* aumentada em relação ao controle, enquanto o grupo tratado com artesunato apresenta uma diminuição da expressão deste gene, embora os dados não sejam estatisticamente significativos. Youns et al. (2009) analisando a expressão gênica por microarray também observou pequena diminuição da expressão de *SOD1* ao tratar células pancreáticas com artesunato. Como a *SOD1* só teve a expressão aumentada pelo tratamento com ATM, talvez ela tenha maior potencial de gerar estresse oxidativo do que o ART. De acordo com Effert et al. (2002, 2003 e 2005), as células tumorais também podem apresentar resistência ao artesunato devido a indução da expressão de genes anti-oxidativos DHDH (codifica *dihydrodiol dehydrogenase*), GCLC/GCLM (codifica GCL), GSTM4, GSTT2, GSTZ1 (todas codificadoras de glutathionas-S-transferases), e MGST3 (codifica microsomal glutathione S-transferase 3 microssomal).

Apesar da análise da expressão gênica não ter atingido significância estatística na concentração de ATM e ART estudadas, as análises ajudaram a entender um pouco do mecanismo de ação destas substâncias. Frente aos dados obtidos conclui-se que tanto a ATM quanto o ART apresentaram efeito genotóxico e alteraram a expressão de mRNA da caspase 3, proteína efetora na cascata apoptótica, podendo indicar que em concentrações maiores, a citotoxicidade encontrada pode ser devida a elevados danos no DNA que por sua vez, desencadeiam a via de apoptose.

Referências

- Brewer, T.G., Grate, S.J., Peggins, J.O., Weina, P.J., Petras, J.M., Levine, B.S., Heiffer, M.H., Schuster, B.G., 1994. Fatal neurotoxicity of arteether and artemether. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 51, 251–259.

- Brossi, A., Venugopalan, B., Dominguez, G.L., Yeh, H.J.C., Flippen-Anderson, J.L., Buchs, P., Luo, X- D., Milhous, W., Peters, W., 1988. Arteether, a new antimalarial drug: Synthesis and antimalarial properties. *Journal of Medicinal Chemistry* 31, 645.
- Clark, R.L., White, T.E.K., Clode, S.A., Gaunt, I., Winstanley, P., Ward, S.A., 2004. Developmental toxicity of artesunate and an artesunate combination in the rat and rabbit. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology* 71, 380–394.
- Denault, J.B., Salvesen, G.S., 2002. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chemical Reviews* 102, 4489-500.
- Disbrow, G.L., Baegem, A.C., Kierpiec, K.A., Yuan, H., Centeno, J.A., Thibodeaux, C.A., Hartmann, D., Schlegel, R., 2005. Dihydroartemisinin is cytotoxic to papillomavirus-expressing epithelial cells in vitro and in vivo. *Cancer Research* 65(23), 10854-10861.
- Du, J.H., Zhang, H.D., Ma, Z.J., Ji, K.M., 2010. Artesunate induces oncosis-like cell death in vitro and has antitumor activity against pancreatic cancer xenografts in vivo. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 65, 895–902.
- Efferth, T., Dunstan, H., Sauerbrey, A., Miyachi, H., Chitambar, C.R., 2001. The anti-malarial artesunate is also active against cancer. *International Journal of Oncology* 18, 767-773.
- Efferth, T., 2007. Willmar Schwabe Award 2006: antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin—from bench to bedside. *Planta Medica* 73, 299–309.
- Efferth, T., Olbrich, A., Bauer, R., 2002. mRNA expression profiles for the response of human tumor cell lines to the antimalarial drugs artesunate, arteether, and artemether. *Biochemical Pharmacology* 64, 617–23.
- Efferth, T., Sauerbrey, A., Olbrich, A., Gebhart, E., Rauch, P., Weber, H.O., Hengstler, J.G., Halatsch, M.E., Volm, M., Tew, K.D., Ross, D.D., Funk, J.O., 2003. Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines. *Molecular Pharmacology* 64, 382–94.
- Efferth, T., Volm, M., 2005. Glutathione-related enzymes contribute to resistance of tumor cells and low toxicity in normal organs to artesunate. *In Vivo* 19, 225–32.

- Fotakis, G., Timbrell, J.A., 2006. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* 160(2), 171-7.
- Hou, J., Wang, D., Zhang, R., Wang, H., 2008. Experimental therapy of hepatoma with artemisinin and its derivatives: in vitro and in vivo activity, chemosensitization, and mechanisms of action. *Clinical Cancer Research* 14(17), 5519–5530.
- Jeyadevan, J.P., Bray, P.G., Chadwick, J., Mercer, A.E., Byrne, A., Ward, S.A., Park, B.K., Williams, D.P., Cosstick, R., Davies, J., Higson, A.P., Irving, E., Posner, G.H., O'Neill, P.M., 2004. Antimalarial and antitumor evaluation of novel C-10 non-acetal dimers of 10beta-(2-hydroxyethyl)deoxoartemisinin. *Journal of Medicinal Chemistry* 47(5), 1290-1298.
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T., 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *Meeker-McLeod-Sibley Community Health Services* 3, 103-115.
- Lai, H., Singh, N.P., 1995. Selective cancer cell cytotoxicity from exposure to dihydroartemisinin and holotransferrin. *Cancer Letters* 91, 41-46.
- Li, P.C., Lam, E., Roos, W.P., Zdzienicka, M.Z., Kaina, B., Efferth, T., 2008. Artesunate Derived from Traditional Chinese Medicine Induces DNA Damage and Repair. *Cancer Research* 68(11), 4347-51.
- Longo, M., Zanoncelli, S., Manera, D., Brughera, M., Colombo, P., Lansen, J., Mazue, G., Gomes, M., Taylor, W. R. J., and Oliaro, P., 2006. Effects of the antimalarial drug dihydroartemisinin (DHA) on rat embryos in vitro. *Reproductive Toxicology* 21, 83–93.
- 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., 2010. Anti-cancer effects of artesunate in a panel of chemoresistant neuroblastoma cell lines. *Biochemical Pharmacology* 79, 130–136.
- Murphy, B.M., Martim, S.J., 2003. Caspases. In: Yin, X.M.; Dong, Z. *Essentials of Apoptosis*. New Jersey: Humana Press Inc., 3-12.

- Olliaro, P.L., Taylor, W.R., 2004. Developing artemisinin based drug combinations for the treatment of drug resistant falciparum malaria: a review. *Journal of Postgraduate Medicine* 50, 40–44.
- Paffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.
- Paffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), e36.
- Posner, G.H., Paik, I.H., Sur, S., McRiner, A.J., Borstnik, K., Xie, S., Shapiro, T.A., 2003. Orally active, antimalarial, anticancer, artemisinin-derived trioxane dimers with high stability and efficacy. *Journal of Medicinal Chemistry* 46(6), 1060-5.
- Preston, J.R., 2007. Epigenetic processes and cancer risk assessment. *Mutation Research* 616(1-2), 7-10.
- Rimada, R.S., Gatti, W.O., Jeandupeux, R., Cafferata, L.F.R., 2009. Isolation, characterization and quantification of artemisinin by NMR from Argentinean *Artemisia annua* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 8 (4), 275 – 281.
- Sato, K., Adachi, T., Ueda, D., Hojo, M., Tomita, Y., 2007. Measurement of local strain on cell membrane at initiation point of calcium signaling response to applied mechanical stimulus in osteoblastic cells. *Journal of Biomechanics* 40, 1246–1255.
- Schmuck, G., Roehrdanz, E., Haynes, R. K., Kahl, R., 2002. Neurotoxic mode of action of artemisinin. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy*** 46, 821–827.
- Singh, N.P., Lai, H., 2001. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells. *Life Sciences* 70, 49-56.
- Smith, S.L., Fishwick, J., McLean, W.G., Edwards, G., Ward, S.A., 1997. Enhanced in vitro neurotoxicity of artemisinin derivatives in the presence of haemin. *Biochemical Pharmacology* 53, 5–10.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. Rohlf. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3^a ed. W. H. Freeman and Co.

- Sugaya, S., Nakanishi, H., Tanzawa, H., Sugita, K., Kita, K., Suzuki, N., 2005. Down-regulation of SMT3A gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) cells. *Mutation Research* 578, 327–332.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, 206-221.
- Toyoda, E., Kagaya, S., Cowell, I.G., Kurosawa, A., Kamoshita, K., Nishikawa, K., Iizumi, S., Koyama, H., Austin, C.A., Adachi, N., 2008. NK314, a topoisomerase II inhibitor that specifically targets the alpha isoform. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 23711–20.
- U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA), 2005. Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. Disponível em: www.epa.gov/cancerguidelines. Acesso em novembro de 2010.
- Voïtchovsky, K., Contera, S.A., Kamihira, M., Watts, A., Ryan, J.F., 2006. Differential stiffness and lipid mobility in the leaflets of purple membranes. *Biophysical Journal* 90, 2075–2085.
- WHO, 2004. Roll Back Malaria. Facts on ACTs: An update on recent progress in policy and access to treatment.
- WHO, 2010. WHO calls on malaria-endemic countries to strengthen monitoring of antimalarial drug efficacy. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/malaria_20101118. Acesso em novembro de 2010.
- Yajko, D.M., Madej, J.J., Lancaster, M.V., Sanders, C.A., Owthon, V.L., Gee, B., Babst, A., Hadley, W.K., 1995. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agentes for *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 2324-7.

- Youns, M., Efferth, T., Reichling, J., Fellenberg, K., Bauer, A., Hoheisel, J.D., 2009. Gene expression profiling identifies novel key players involved in the cytotoxic effect of Artesunate on pancreatic cancer cells. *Biochemical Pharmacology* 78, 273–283.
- Zhang, S., Chen, H., Gerhard, G.S., 2010. Heme synthesis increases artemisinin-induced radical formation and cytotoxicity that can be suppressed by superoxide scavengers. *Chemico-Biological Interactions* 186, 30–35.

Tabela 1 – Total e scores de danos em células HepG2 tratadas com Artemisinina e Artesunato. (Coletadas após 3 horas de tratamento).

Tratamentos	Classes dos cometas					Scores
	Total ¹	0	1	2	3	
Controle	9	91	8	1	0	10
	11	89	9	2	0	13
	13	87	10	2	1	17
	11 ± 2,0					13,3 ± 3,5
Artemisinina [2,5 µg]	93	7	46	42	5	145
	90	10	46	37	7	141
	92	8	45	40	7	146
	91,6 ± 1,5***					144 ± 2,6***
Artemisinina [5 µg]	90	10	42	35	13	151
	95	5	48	38	9	151
	91	9	41	39	11	152
	92 ± 2,6***					151,3 ± 0,5***
Artemisinina [10 µg]	94	6	42	33	19	165
	96	4	46	37	13	159
	97	3	38	36	23	179
	95,6 ± 1,5***					167,6 ± 10***
Artesunato[2,5 µg]	52	48	40	12	0	64
	62	38	48	14	0	76
	70	30	53	16	1	88
	61,3 ± 9,0***					76 ± 12***
Artesunato[5 µg]	70	30	53	14	3	90
	64	36	38	23	3	93
	68	32	46	20	2	92
	67,3 ± 3,0***					91,6 ± 1,5***
Artesunato[10 µg]	92	8	41	34	17	160
	94	6	31	43	20	177
	98	2	29	53	16	183
	94,6 ± 3,0***					173,3 ± 11,9***
Doxorrubicina[2 µg]	95	5	15	39	41	166
	91	9	29	46	16	169
	92	8	25	52	15	174
	91 ± 4,5					169,6 ± 4,0

* Significativamente diferente do controle negativo (p < 0.05).

** Significativamente diferente do controle negativo (p < 0.01).

*** Significativamente diferente do controle negativo (p < 0.001).

¹Total de células com danos (Classes 1+2+3)

UNIDADES DE FLUORESCÊNCIA		
	Artemisinina (ATM)	Artesunato (ART)
Controle	428426.5 ± 21639	476632.5 ± 33195
Doxorrubicina [2 µg/mL]	355638.5 ± 21385	317649.5 ± 27746***
ART [2,5 µg/mL]	367915.8 ± 41146	512187.1 ± 36849
ART [5 µg/mL]	321101 ± 39443**	481540 ± 40981
ART [7,5 µg/mL]	281858.6 ± 70448***	368067.5 ± 61374***
ART [10 µg/mL]	241393.1 ± 23155***	282615.8 ± 25120***
ART [20 µg/mL]	152950.1 ± 48643***	219852.5 ± 32582***

Fig. 1. Resultados das médias das duplicatas do Ensaio de Citotoxicidade com Resazurina.

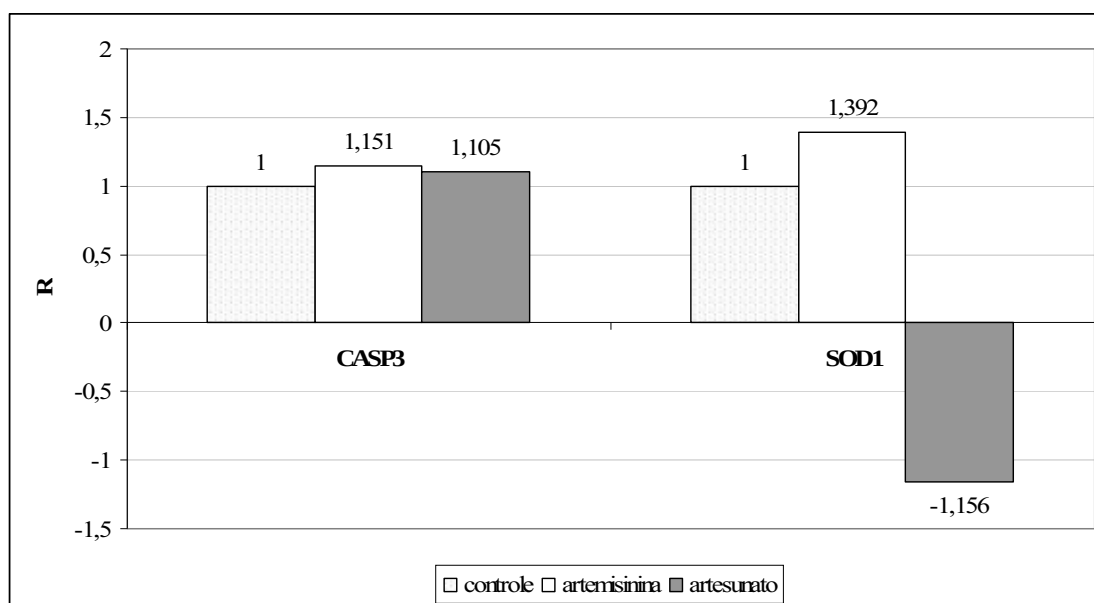


Fig. 2. Expressão relativa dos RNAm de *CASP3* e *SOD1*, quantificado por PCR em tempo real na linhagem HepG2.

ANEXOS

Anexo 1 – Confirmação da submissão do artigo “*Genotoxicity assessment of the antimalaric compound artesunate in somatic cells of mice*” ao *Journal of Applied Toxicology*

ScholarOne Manuscripts Page 1 of 1

 **Journal of Applied Toxicology**

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

[Main Menu](#) → [Authoring Dashboard](#) → [Submission Confirmation](#)



You are logged in as Edson Maistro

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Applied Toxicology*.

Manuscript ID: JAT-10-0420

Title: Genotoxicity assessment of the antimalarial compound artesunate in somatic cells of mice.

Authors: Aquino, Ivani
Perazzo, Fabio
Maistro, Edson

Date Submitted: 28-Dec-2010

 Print  Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.5.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2010. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

 Follow ScholarOne on Twitter

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

<http://mc.manuscriptcentral.com/apptox> 12/28/2010

Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética Experimental da Faculdade de Medicina de Marília, SP.



FACULDADE DE MEDICINA DE MARÍLIA
Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo
Seres Humanos – CEP/FAMEMA

Marília, 30 de Julho de 2009

Ilmo^(a) Sr.^(a)

Prof. Dr. Edson Luis Maistro

Marília/SP

O Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Medicina de Marília, recebeu o protocolo de estudo nº 140/09, intitulado: "Estudo da Atividade Genotóxica e/ou Antigenotóxica do Antimalarígeno Artesunato em Células de Roedores in vivo", foi considerado **APROVADO "Ad Referendum"** após responder as pendências apontadas em Reunião Ordinária – 27/04/09, de acordo com a Resolução 196/96 e suas Complementares do Conselho Nacional de Saúde, podendo ser iniciado.

Sendo só para o momento, reiteramos protestos de consideração e apreço.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Valdeir Fagundes de Queiroz
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos

Anexo 3 – Protocolo de Extração de RNA de Cultura de Células (Invitrogen)

1. Reservar o meio de cultura em tubo de centrifuga estéril
2. Lavar com PBS (2 mL)
3. Tripsinizar as células
4. Inativar com o meio reservado
5. Centrifugar 5 min, 1200 rpm
6. Descartar todo o sobrenadante (verter no descarte e retirar excesso no papel higiênico)

7. Adicionar 250µL de água DEPC e 750µL de Trizol
8. Homogeneizar levemente antes de transferir para microtubos de 2 mL
9. Incubar por 5 min, T ambiente (Obs: se aparecer 2 fases, adicionar mais Trizol)
10. Adicionar 200µL de clorofórmio e agitar vigorosamente por 15 seg na mão e incubar por 5 a 10 min, T ambiente
11. Centrifugar 4°C, 12000 rpm, 15 min (Obs: o volume da fase aquosa será cerca de 70% do volume inicial do Trizol)

12. Transferir a fase aquosa para microtubos de 1,5 mL e Adicionar 500µL de isopropanol por 0,75 mL de Trizol usado inicialmente
13. Incubar por 10 min, T ambiente
14. Centrifugar 4°C, 12000 rpm, 10 min
15. Descartar o sobrenadante e lavar o pellet de RNA com 1 mL de etanol 75% (750µL água etanol + 250 µL de água DEPC) (soltar o pellet com leves batidas)
16. Centrifugar 4°C, 7500 rpm, 5 min
17. Descartar o sobrenadante e deixar secar o pellet brevemente (+/- 15 min; não deixar ficar translúcido). Dissolver em 30µL de água DEPC, homogeneizando levemente
18. TRATAMENTO COM DNase I (de acordo com instruções da bula)
 - Adicionar 3µL do tampão da DNase 10 X e 1µL de DNase I (1u/µL)

 - Incubar por 15 min, T ambiente

19. Incubar 5 min, T 55 °C a 60°C

20. Transferir imediatamente para o gelo

Quantificar e preparar gel para verificar integridade do RNA:

↳ Não se esquecer de deixar a cuba de eletroforese no NaOH (10N) por pelo menos 40 min, lavar, esperar secar e depois preparar o gel.

Gel 1% (40 mL), 70-80V, 30mA, 25-30 min

Aplicar 5 µL amostra/ladder + 3 µL tampão de carregamento

Armazenar o RNA no freezer -80°C

21. SÍNTESE DO cDNA

OBS: Volume final/microtubo = 20 µL

- a) água DEPC → 9,9 µL
- b) dNTP 2,5mM mix → 2 µL
- c) OligodT 10 pmol/µL → 1 µL
- d) Tampão MLV (agitar no vórtex 5 seg) → 4 µL
- e) RNase Out → 0,1 µL
- f) MLV → 1 µL
- g) RNA (500 ng/mL) → 2 µL

↳ Fazer mix para a quantidade necessária de microtubos de cDNA a ser sintetizado, sem o RNA. Distribuir 18 µL em cada microtubo e adicionar os 2 µL de RNA.

↳ Homogeneizar bem levemente. Incubar no termociclador por 50 min, 37°C, seguido de 15 seg a 70°C. Programa cDNA2.

Quantificar

Armazenar o cDNA no freezer -80°C

22. TESTE DE AMPLIFICAÇÃO DOS PRIMERS

OBS: Volume final/microtubo = 25 µL

Preparar o MIX ($y + 1$) de acordo com o número de primers (y) a ser testado.

- a) água DEPC → 18,25 μL
- b) Tampão da Taq 10 X → 2,5 μL
- c) dNTP 10mM mix → 0,25 μL
- d) MgCl_2 50mM → 0,75 μL
- e) Taq → 0,25 μL

↪ Homogeneizar e Distribuir 22 μL do mix/microtubo de cada primer a ser testado e adicionar:

- f) Primer F → 1 μL /microtubo
- g) Primer R → 1 μL /microtubo
- h) cDNA (500 ng) → 1 μL /microtubo

↪ Incubar no termociclador (Programa GAPDH). Programar aparelho com T_m desejada. Leva aproximadamente 2h.

Preparar gel para verificar amplificação: gel 1% (40 mL), 70-80V, 30mA, 60-70 min.

Aplicar 15 μL amostra ou 5 μL ladder + 3 μL tampão de carregamento

23. TESTE DE EFICIÊNCIA DOS PRIMERS (testar diluições na PCR em tempo real) E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

EXEMPLO:

Diluições:

1:5 = 1 μL cDNA + 4 μL água DEPC (MCF-7; OVCAR-3)

PREPARO DO MIX

- a) Preparar 1 mix para cada primer

Volume total/microtubo = 20 μL

- H_2O DEPC - 7 μL
- Primer F – 0,5 μL
- Primer R – 0,5 μL

- cDNA – 2 μ L
- Sybr Green – 10 μ L

↪ Fazer o mix de cada primer para a quantidade necessária de microtubos a ser testado; sem o cDNA. Distribuir 18 μ L em cada poço da microplaca e adicionar os 2 μ L do cDNA correspondente. Manter tudo no gelo e proteger da luz.

Levar em consideração que temos 2 repetições biológicas e que cada uma delas será analisada em triplicata na PCR.