

Renato Mendes Rossi De Lucca

Avaliação dos efeitos mutagênicos e genotóxicos da droga antimalárica lumefantrina
e em combinação com o artemeter em linfócitos humanos

Universidade Federal de Mato Grosso
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Ciências da Saúde

Cuiabá – Mato Grosso

2012

Universidade Federal de Mato Grosso
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Ciências da Saúde

Avaliação dos efeitos mutagênicos e genotóxicos da droga antimalárica lumefantrina
e em combinação com o artemeter em linfócitos humanos

Dissertação Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Faculdade, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Ciências da
Saúde – Área de Concentração: Doenças
tropicais e infecciosas.

Renato Mendes Rossi De Lucca
Orientadora: Profa. Dra. Carmen Lucia Bassi Branco

Cuiabá – Mato Grosso
2012

D366a

De Lucca, Renato Mendes Rossi.

Avaliação dos efeitos mutagênicos e genotóxicos da droga antimalárica lumefantrina e em combinação com o artemeter em linfócitos humanos. / Renato Mendes Rossi De Lucca. Cuiabá: UFMT, 2012.

Mestrado em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Carmem Lucia Bassi Branco

1. Lumefantrina. 2.Artemeter. 3.Efeitos Mutagênicos. 4.Genotóxicos. 5.Apoptose. I.Título.

CDU 61

Universidade Federal de Mato Grosso
Faculdade de Ciências Médicas
Coordenação dos Programas de Pós-Graduação em Medicina
TERMO DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO/TESE
PELO ORIENTADOR

Eu,
pelo presente termo declaro ter feito a devida revisão da
Dissertação/Tese....., de
autoria do Mestrando(o)/doutorando(a)
....., do(a)
qual fui orientador e certifiquei de que todas as orientações,
sugestões e necessidades de correções feitas pela Banca
Examinadora da Defesa foram acatadas e cumpridas. Sendo assim,
o texto está pronto para ser encadernado e entregue à
Coordenação de Pós-Graduação da FCM.
Além disso confirmo que o resultado da pesquisa objeto da
Dissertação/Tese foi aceito para publicação no Periódico
....., estando o Mestrando(o)/Doutorando(a)
liberado(a) para prosseguir com a tramitação, junto à
CPPGM/FCM/UFMT, para a obtenção do seu Diploma de
Mestre/Doutor. Portanto, autorizo a entrega dos exemplares
encadernados da mesma.

Data...../...../.....

.....
Nome e assinatura do orientador

A minha companheira Tairine e a minha família

Agradecimentos

Agradeço primeiro à aquele que me deu a oportunidade de estar neste planeta para poder crescer .

Agradeço aos meus pais, meu irmão e minha tia Selma que mesmo longe me deram maior força e apoio sempre no que eu precisei.

A minha companheira Tairine, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos bons e ruins sempre me levantando quando eu precisava e me dando força quando eu já estava cansado.

A Profa. Carmen, que me aguentou nesses dois anos, que puxou minha orelha quando eu estava com corpo mole e que me ensinou a estudar de verdade.

Agradeço a todos os outros professores que me auxiliaram emprestando materiais e equipamentos e também me dando muito conhecimento, Prof. Cor , Prof. Amilcar, Profa. Bianca, Profa Nair, Profa Rosane, Profa. Eliana (Unesp) e muitos outros que estiveram por traz das câmeras.

Agradeço também ao pessoal da banca Prof. Rogério, Prof. Fabrício, Profa Raquel, que se disponibilizaram e auxiliaram para engrandecer o trabalho.

Aos técnicos de laboratório que estavam sempre lá também nos ajudando no que era necessário , nas festinhas e no trabalho a Gê, a Daiane, seu Nilson, a Jô, e até o Edmala que abandonou agente , um abraço a todos.

Aos meus amigos que não deixaram eu desistir , Samy e Pôneis, e minhas amigas que me abraçaram quando eu precisei, Tainá e Adna.

Aos meus parceiros de Lab, que tivemos discussões, mas tudo se resolvia, sempre dando força para o outro nos trabalhos seja dentro do lab ou fora um grande abraço ao, Marco, Mari, Suzy, Samantha, Hugo, Wal, Eduardo, Dani, os dois Lucianos e muitos outros que estiveram por lá.

Obrigado a todos, de coração.

Se eu me esqueci de alguém vem falar comigo que eu agradeço pessoalmente =)

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar,
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Madre Tereza de Cálcuta

SUMÁRIO

1. Introdução	17
1.1. Aspectos gerais e epidemiológicos da malária	17
1.2. Terapia utilizada contra a malária	23
1.3. Drogas: Artemeter, lumefantrina e a combinação	27
1.3.1. Artemisina e derivados	27
1.3.2. Lumefantrina	29
1.3.3. Coartem® (Artemeter + Lumefantrina)	30
1.4. Modo de ação	31
1.5. Mutagênese e antimaláricos	34
2. Objetivos	44
2.1. Objetivo geral	44
2.2. Objetivos específicos	44
3. Material e métodos	45
3.1. Cultura de células	45
3.2. Escolha das concentrações das drogas para os testes	46
3.3. Teste do micronúcleo	48
3.4. Ensaio cometa	49
3.5. Separação de linfócitos por densidade para os testes de necrose e apoptose	51
3.6. Teste de apoptose para a detecção de caspase-3 ativa	52
3.7. Teste de necrose	52
3.8. Análise estatística	53
4. Resultados	54
4.1. Ensaio cometa	54

4.1.1. “Tail moment” (MN)	54
4.2. Teste do micronúcleo.....	55
4.2.1. Micronúcleos (MN)	55
4.2.2. Brotos nucleares (BnN)	58
4.2.3. Pontes nucleoplasmáticas (PNP)	59
4.2.4. Índice de divisão nuclear (IDN)	61
4.3. Apoptose.....	65
4.4. Necrose.....	68
4.5. Lumefantrina versus lumefantrina + artemeter (6:1).....	70
5. Discussão.....	73
6. Conclusão.....	79
7. Referências bibliográficas.....	80
8. ANEXOS.....	93

Lista de tabelas

Tabela 1. Média $\pm$ desvio padrão dos ensaios mutagênicos e genotóxicos da droga lumefantrina.....63

Tabela 2. Média $\pm$ desvio padrão dos ensaios mutagênicos e genotóxicos da combinação das drogas lumefantrina + artemeter.....64

Tabela 3. % de apoptose em 0h, 24h, 48h e 72h de tratamento com as diferentes concentrações de lumefantrina e a combinação(+) lumefantrina + artemeter.....65

Tabela 4. % de necrose em 0h, 6h, 12h e 24h de tratamento com as diferentes concentrações de lumefantrina.....70

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo da malária, adaptado de

http://www.cdc.gov/malaria/images/graphs/life_cycle/malaria_LifeCycle.gif , 2012.....20

Figura 2. Estrutura química da artemisina, artesunato e artemeter.....28

Figura 3. Estrutura química da lumefantrina.....30

Figura 4. Representação do ensaio genotóxico onde em A) as regiões do cometa e em B) os níveis de dano no DNA representado pelos diferentes tamanhos da cauda do cometa....40

Figura 5. Linfócitos binucleados contendo um ou mais micronúcleos, adaptado Fenech, 2003.....41

Figura 6. Linfócitos binucleados apresentando brotos nucleares, adaptado Fenech, 2003.....42

Figura 7. Linfócitos binucleados apresentando pontes nucleoplasmáticas, adaptado Fenech, 2003.....42

Figura 8. Linfócitos apresentando um, dois, três e quatro núcleos após a divisão celular na presença de citocalasina -B, adaptado Fenech, 2003.....43

Figura 9. Dano genotóxico em linfócitos T em resposta aos diferentes tratamentos com a droga lumefantrina após 3h de tratamento, * $p < 0,01$ (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).....54

Figura 10. Dano genotóxico em linfócitos T em resposta aos diferentes tratamentos com a combinação das drogas lumefantrina + artemeter (6:1) após 3h de tratamento, * $p < 0,01$ (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).....55

Figura 11. Micronúcleos (MN) em 1000 células binucleadas (BN) nos diferentes tratamentos com a droga lumefantrina após 48h de tratamento, * $p < 0,01$ (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).....	56
Figura 12. Micronúcleos (MN) em 1000 células binucleadas (BN) nos diferentes tratamentos com a combinação das drogas lumefantrina + artemeter após 48h de tratamento, * $p < 0,01$ (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).....	57
Figura 13. Brotos nucleares (BrN) em 1000 células binucleadas (BN) nos diferentes tratamentos com a droga lumefantrina após 48h de tratamento, * $p < 0,01$ (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).....	58
Figura 14. Brotos nucleares (BrN) em 1000 células binucleadas (BN) nos diferentes tratamentos com a combinação das drogas lumefantrina + artemeter após 48h de tratamento, * $p < 0,01$ (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).....	59
Figura 15. Pontes nucleoplasmáticas (PNP) em 1000 células binucleadas (BN) nos diferentes tratamentos com a droga lumefantrina após 48h de tratamento, * $p < 0,01$ (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).....	60
Figura 16. Pontes nucleoplasmáticas (PNP) em 1000 células binucleadas (BN) nos diferentes tratamentos com a combinação das drogas lumefantrina + artemeter após 48h de tratamento, * $p < 0,01$ (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).....	60
Figura 17. Índice de divisão nuclear (IDN) em 500 células nos diferentes tratamentos com a droga lumefantrina após 48h de tratamento, * $p < 0,01$ (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).....	61

Figura 18. Índice de divisão nuclear (IDN) em 500 células nos diferentes tratamentos com a combinação das drogas lumefantrina + artemeter após 48h de tratamento, * $p < 0,01$ (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).....	62
Figura 19. % de apoptose em 500 células nos diferentes tempos e tratamentos com a droga lumefantrina, * $p < 0,05$ e # $p < 0,01$ (ANOVA/ pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).....	66
Figura 20. % de apoptose em 500 células nos diferentes tempos e tratamentos com a combinação das drogas lumefantrina + artemeter, * $p < 0,05$ e # $p < 0,01$ (ANOVA/ pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).....	67
Figura 21. % de apoptose em 500 células nos diferentes tempos (0, 6, 12 e 24h) e tratamentos com a droga lumefantrina.....	68
Figura 22. % de necrose em 500 células nos diferentes tempos e tratamentos com a droga lumefantrina.....	69
Figura 23. Comparação das médias $\pm$ desvio padrão entre os tratamentos com a droga lumefantrina pura (C80 e C60) e combinada com o artemeter (C80+ e C60+) onde em A) o “tail moment” (TM), em B) a quantidade de micronúcleos (MN), em C) os brotos nucleares (BrN), já em D) e E) as pontes nucleoplasmáticas (PNP) e o índice de divisão nuclear (IDN) respectivamente.....	71
Figura 24. Comparação das médias $\pm$ desvio padrão de células apoptóticas (%) entre os tratamentos com a droga lumefantrina pura (C80 e C60) e combinada com o artemeter (C80+ e C60+), onde em A) os tratamentos C80 e C80+ e em B) os tratamentos C60 e C60+.....	72

Lista de Abreviaturas

ANOVA – Análise de Variância

B.O.D – Demanda Bioquímica de Oxigênio

BER – Reparo por Excisão de Bases

BN – Binucleada

BrN – Broto nuclear

CBPI – Índice de Proliferação por Bloqueio da Citocinese

C.I. 50 – Concentração Inibitória de 50%

CYP2B6 – Citocromo P450 2B6

CYP3A4 – Citocromo P450 3A4

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

DAF – Diacetato de Fluorescência

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

HAP – Hidrocarboneto Aromático Policíclico

HO – Hoechst 33342

IDN – Índice de Divisão Nuclear

MN – Micronúcleo

NER – Reparo por Excisão de Nucleotídeos

OECD - Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico

P. falciparum – *Plasmodium falciparum*

P. knowlesi – *Plasmodium knowlesi*

P. malarie – *Plasmodium malarie*

P. ovale – *Plasmodium ovale*

P. vivax – *Plasmodium vivax*

PfcRT - Plasmodium falciparum chloroquine Resistance Transporter

pH – Potencial Hidrogeniônico

PI – Iodeto de Propídio

PNP – Ponte Nucleoplasmática

RNA – Ácido Ribonucleico

RNS – Espécie Reativa de Nitrogênio

ROS – Espécie Reativa de Oxigênio

S9 – Mix de enzimas hepáticas

SUS – Sistema Único de Saúde

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TM – *Tail Moment* (Momento da causa)

Resumo

A combinação de lumefantrina + artemeter tem sido usada como tratamento alternativo para malária grave onde há uma resistência a cloroquina. No entanto, as atividades mutagênicas e genotóxicas dessas drogas ainda não são bem conhecidas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos mutagênicos, genotóxicos e apoptóticos *in vitro* da lumefantrina e em combinação com o artemeter em linfócitos T humanos. Células de 8 (4 para teste com lumefantrina e 4 para lumefantrina + artemeter) doadores saudáveis foram tratadas com 100, 80 e 60 µg/ml (C100, C80 e C60) de lumefantrina; para o tratamento combinado, as células foram tratadas com 80, 60, 30, 9 e 6 µg/ml de lumefantrina + 13,3, 10, 5, 1,5 e 1 µg/ml de artemeter respectivamente (C80+, C60+, C30+, C9+ e C6+). Foram incluídos nos testes um controle negativo (CN), um controle de solvente (CS, DMSO 2%) e um controle positivo (CP, 0,03 µg/ml de doxorubicina). O efeito genotóxico foi avaliado pelo ensaio cometa, o mutagênico foi pelo teste do micronúcleo (MN) e apoptose foi avaliada pela presença de caspase 3 ativa. Os tratamentos C100 (TM = $40,41 \pm 2,58$), C80 (TM = $28,09 \pm 1,34$), C60 (TM = $14,99 \pm 1,46$), C80+ (TM = $30,09 \pm 2,54$) e C60+ (TM = $14,31 \pm 0,84$) mostraram um aumento significativo ($p < 0.01$) no efeito genotóxico quando comparado ao CS (TM = $6,23 \pm 0,95$). Além disso, os tratamentos C100, C80 e C60 aumentaram significativamente ($p < 0.01$) o número de MN (MN = $70,75 \pm 6,10$, $83,25 \pm 7,11$ e $36,5 \pm 3,7$) e brotos nucleares (BRN = $26 \pm 5,03$, $29 \pm 8,75$, $24 \pm 10,23$) quando comparado ao CS (MN = $9,25 \pm 1,7$; BRN = $4,5 \pm 1,0$), igualmente os tratamentos C80+ (MN = $75,25 \pm 8,3$; BRN = $25,25 \pm 5,85$) e C60+ (MN = $31 \pm 4,96$; BRN = $5,22 \pm 5,44$) em relação ao CS+ (MN = $7,25 \pm 0,5$; BRN = $4,25 \pm 1,7$). O Índice de Divisão Nuclear (IDN) diminuiu significativamente ($p < 0.05$) nos tratamentos C100 (IDN = 1,73), e também nos tratamentos C80+ (IDN = 1,82) e C60+ (IDN = 1,94) comparados ao CS e CS+ (IDN = 2,25 e 2,06, respectivamente). Todos os tratamentos com exceção do C30+, apresentaram um aumento significativo ($p < 0.05$) na apoptose em todos os tempos avaliados. Estes resultados demonstram que a lumefantrina e a lumefantrina + artemeter possuem efeitos mutagênicos e genotóxicos (possivelmente pelo aumento do estresse oxidativo). Em adição, os tratamentos com a lumefantrina e a lumefantrina + artemeter elevaram a apoptose das células em resposta ao dano no DNA, além de possivelmente parar o ciclo celular (efeito citostático). Entretanto, concentrações de lumefantrina + artemeter próximas das observadas no plasma após o tratamento de pacientes com malária não apresentaram danos no DNA e, portanto, se mostraram seguras neste ponto de vista.

Palavras chave: lumefantrina, artemeter, efeitos mutagênicos, genotóxicos, apoptose

Abstract

The lumefantrine + artemether combination has been used as an alternative treatment of severe malaria chloroquine-resistant. However, the genotoxicity and mutagenicity of these compounds are not known. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* mutagenic, genotoxic and apoptotic effects of lumefantrine and lumefantrine+ artemether in human T lymphocytes. Cells of 8 (4 for testing with lumefantrine and 4 from lumefantrine+ artemether) healthy donors were treated with 100, 80 and 60 µg/ml (C100, C80 and C60) of lumefantrine; to the combined treatment, cells were treated with 80, 60, 30, 9 and 6 µg/ml of lumefantrine plus 13.3, 10, 5, 1.5 and 1 µg/ml of artemether, respectively (C80+, C60+, C30+, C9+, and C6+). Negative control (CN), solvent control (CS, DMSO 2%) and positive control (CP, 0.03 µg/ml of doxorubicin) were evaluated in all experiments. The genotoxicity was assessed by comet assay, the mutagenic effect by the micronucleus assay (MN) and apoptosis by the presence of active caspase 3. C100 (TM = 40.41 ± 2.58), C80 (TM = 28.09 ± 1.34), C60 (TM = 14.99 ± 1.46), C80+ (TM = 30.09 ± 2.54) and C60+ (TM = 14.31 ± 0.84) treatments showed significant ($p < 0.01$) genotoxic effects when compared to CS (TM = 6.23 ± 0.95). Furthermore, C100, C80 and C60 treatments increased significantly ($p < 0.01$) the number of MN (MN = 70.75 ± 6.10 , 83.25 ± 7.11 and 36.5 ± 3.7) and nuclear buds (BrN = 26 ± 5.03 , 29 ± 8.75 , 24 ± 10.23) when compared to CS (MN = 9.25 ± 1.7 ; BRN = 4.5 ± 1.0), as well as the treatments C80+ (MN = 75.25 ± 8.3 ; BRN = 25.25 ± 5.85) and C60+ (MN = 31 ± 4.96 ; BRN = 5.22 ± 5.44) when compared to CS+ (MN = 7.25 ± 0.5 ; BRN = 4.25 ± 1.7). The Nuclear Division Index (IDN) decreased significantly ($p < 0.05$) in C100 (IDN = 1.73), and also in treatments C80+ (IDN = 1.82) and C60+ (IDN = 1.94) compared to CS and CS+ (IDN = 2.25 and 2.06, respectively). All treatments, except C30+, showed a significant increase ($p < 0.05$) in apoptosis at all times evaluated. The results demonstrate that lumefantrine and lumefantrine + artemether have a mutagenic and genotoxic effect (possibly by increasing oxidative stress). In addition, the treatment with lumefantrine and lumefantrine+ artemether elicited apoptosis of the cells in response to DNA damage, and possibly cell cycle arrest (cytostatic effect). However, concentrations of lumefantrine + artemether close to those observed in plasma after treatment for malaria does not show damage in DNA and, therefore, are safe from that standpoint.

Key words: Lumefantrine, Artemether, Mutagenic effect, Genotoxic , Apoptosis

1. Introdução

1.1. Aspectos gerais e epidemiológicos da Malária

A malária é uma doença tropical infecciosa aguda, causada por um protozoário do filo Apicomplexa, família Plasmodiidae, gênero *Plasmodium* e transmitida pelo repasto sanguíneo de fêmeas de mosquito do gênero *Anopheles* (Neves et al, 2007; Rey et al, 2008). Encontram-se cinco principais espécies para o *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*) cujo possui a capacidade de infectar o ser humano (Marelli et al, 1998; Mendis et al, 2001; Cox-Sigh and Sigh, 2008; White, 2008).

Mesmo sendo uma doença com relatos antigos, a malária ainda hoje é um dos principais problemas de saúde pública nos países da região tropical, onde são constatados cerca de 300 a 500 milhões de novos casos a cada ano, acarretando em cerca de 1 a 2 milhões de mortes, principalmente entre crianças menores de cinco anos e em mulheres grávidas (Bremán, 2001; Snow et al, 2005; Neves et al, 2007; SIVEP-malária, 2010).

Apesar de grande parte da população mundial estar sob risco de contrair a doença, sua incidência maior é na África, que responde por 85% dos novos casos estimados (Bremán et al, 2004; OMS, 2010).

Já no Brasil, quase a totalidade dos casos se restringem a Amazônia Legal, da qual fazem parte os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Maranhão e Mato Grosso, sendo que casos esporádicos encontrados em outras partes do país geralmente são devido a visitantes vindos desta região (Loiola et al, 2002; SIVEP-malária, 2010).

Um aspecto relevante é que a malária pode afetar a qualidade de vida e trazer problemas econômicos para as populações endêmicas, uma vez que durante as

crises febris o indivíduo fica debilitado dificultando sua atividade laboral (Mendis et al, 2001; Breman et al, 2004).

Das quatro espécies mais relevantes que afetam o ser humano, o Brasil só não possui a espécie *P. ovale*, pois as condições climáticas do país não são favoráveis ao desenvolvimento da espécie do vetor que carrega este agente (Ministério da Saúde, 2005).

No Brasil a maior parte dos casos de malária deve-se a infecção com o *P. vivax*, correspondendo a 85% dos casos, seguido por *P. falciparum*, com 15% dos casos e menos de 1% dos casos são recorrentes da infecção por *P. malarie* (OMS, 2009).

As infecções pelo *P. vivax* no Brasil e no mundo tem aumentado nos últimos anos, pois, por não ser considerada tão letal quanto às infecções pelo *P. falciparum*, o *P. vivax* tem sido visto como sendo benigno e com menor prioridade de pesquisas e atenção a este parasito (Price et al, 2007).

Outro aspecto importante, é que o tratamento da malária por *P. vivax* é constituído por duas fases, o que faz com que muitos infectados abandonem o tratamento por ser prolongado, favorecendo assim as recaídas dos pacientes (Abdon et al, 2001).

O *P. falciparum* é estimado como o mais perigoso por causar a malária grave e a malária cerebral, onde o risco de morte é muito alto. Apesar de ser o segundo mais encontrado no Brasil, ele é o mais comum em algumas regiões da África, Ásia e norte da América do Sul (Breman, 2001).

Apesar de causarem a mesma enfermidade, os parasitos possuem morfologia e características específicas diferentes entre si, que acabam por resultar em algumas manifestações clínicas diferentes da doença.

O *P. falciparum* invade hemácias em todas as suas fases, desde jovens até hemácias velhas; possui uma fase de incubação de aproximadamente 12 dias (Torres e Domingos, 2005). Passa uma única vez pelos hepatócitos e, portanto, não possui forma latente (hipnozoítos). O que chama a atenção são seus gametócitos que apresentam o formato de lua crescente (Neves et al, 2007).

Sua habilidade de invadir todas as fases da hemácia traz consequências graves, como um aumento muito rápido da parasitemia. Além disso, causa alterações nessas células, levando-as a adesão no endotélio vascular do hospedeiro (Heddini, 2002; Torres e Domingos, 2005).

Dentre a sintomatologia causada pelo *P. falciparum*, se destaca o comprometimento cerebral, anemia severa, deficiências renais e pulmonares, podendo causar sequelas ou levar o indivíduo a morte (Heddini, 2002).

O *P. vivax*, possui um tempo de incubação maior, variando de 12 a 17 dias, com uma fase de latência que possibilitam recaídas da doença e invade apenas hemácias jovens, conhecidas como reticulócitos. Por este motivo, o aumento da parasitemia não é tão acentuado quanto à do *P. falciparum* (Ministério da Saúde, 2005; Neves et al, 2007).

O parasito da malária possui dois ciclos (Figura 1): um no hospedeiro vertebrado no caso o homem, e outro no hospedeiro invertebrado correspondente a fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*.

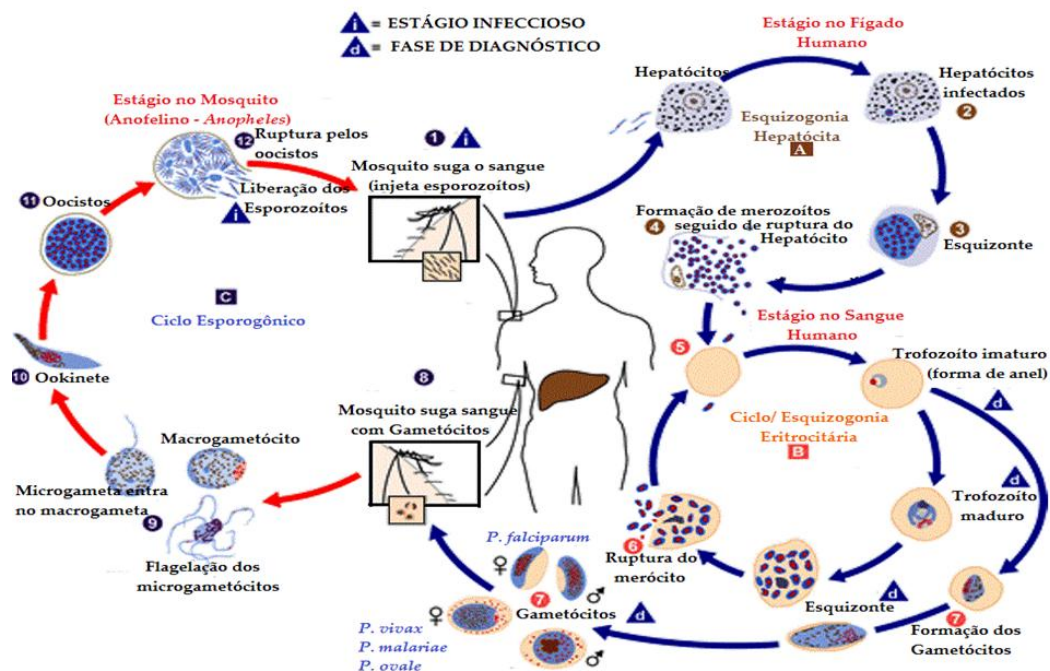


Figura 1. Ciclo da malária, adaptado de http://www.cdc.gov/malaria/images/graphs/life_cycle/malaria_LifeCycle.gif, 2012.

Na infecção natural nos humanos, o *Plasmodium*, na forma esporozoíta infectante, é “injetado” na corrente sanguínea via repasto do anofelino; cerca de 15 a 200 esporozoítos são depositados no sangue do indivíduo. Em seguida o parasito se encaminha para os hepatócitos, onde se diferenciam em formas trofozoítas e, por reprodução assexuada, dão origem aos esquizontes teciduais e, posteriormente, a milhares de merozoítos. Esta primeira fase se chama exoeritrocítica ou tecidual, por não envolver as hemácias do hospedeiro e preceder o ciclo sanguíneo do *Plasmodium* (Banister et al, 2000; Neves et al, 2007; Rey, 2008)..

Após serem diferenciados alguns merozoítos permanecem em estado latente nos hepatócitos, sendo então denominados hipnozoítas. Esses são responsáveis pelas recaídas tardias, principalmente na malária causada pelo *P. vivax*. A grande maioria dos merozoítos são liberados para as vias sanguíneas invadindo as hemácias e iniciando, assim, o ciclo eritrocítico (Mota et al, 2001; Bannister et al, 2003).

O ciclo eritrocítico tem uma grande importância no desenvolvimento do parasito. O *Plasmodium*, neste ciclo, pode metabolizar a hemoglobina em aminoácidos que vão ser utilizados como fontes de nutrientes para sua maturação (Goldberg e Slater, 1992).

Interessante ressaltar que a hemoglobina tem um papel importante no desenvolvimento do parasito e, em casos de algumas doenças falcêmicas onde o individuo se torna deficiente em hemoglobina, há uma diminuição tanto na contaminação quanto no crescimento dos parasitos (Joishy et al, 1988; Chotivanich et al, 2002).

O desenvolvimento intra-eritrocítico do parasita se dá por esquizogônia, que é um tipo de reprodução assexuada onde um único parasito pode se dividir em aproximadamente 4 células filhas, novos merozoítos, que invadem novas hemácias (CDC, 2012).

Depois de algumas gerações de merozoítas sanguíneos, essas se diferenciarão no estágio sexuado, os macrogametócitos (femininos) e os microgametócitos (masculinos), que não se dividem mais. Essas formas sexuadas, depois de ingeridas pelo vetor, seguem seu desenvolvimento dando origem a novos esporozoítos, que são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado, no caso o homem (Neves et al, 2007; Rey, 2008).

Após a fase de incubação do parasito existe uma fase sintomática inicial normalmente caracterizada para todas as espécies de *Plasmodium*, por causar um mal-estar, cefaleia, cansaço e dores no corpo, sintomas que precedem a clássica febre da malária. Esta tem início com calafrios que duram de 15 minutos à uma hora, seguidos por uma fase febril, com temperatura corpórea podendo atingir 41°C ou mais, dependendo do sistema imunológico do hospedeiro. Após um período de duas

a seis horas, ocorre à baixa da febre e o paciente apresenta sudorese profusa e fraqueza intensa (Neves et al, 2005; Rey, 2008; Breaman, 2001; Ministério da Saúde, 2005).

Após a fase inicial, a febre assume um caráter intermitente, dependente do tempo de duração dos ciclos eritrocíticos de cada espécie de plasmódio, sendo 48 horas para *P. falciparum* e *P. vivax* (malária terçã) e 72 horas para *P. malariae* (malária quartã) (Ministério da Saúde, 2005).

A malária pode causar vários sintomas, dependendo da quantidade parasitária, da resposta imunológica do indivíduo e da espécie do parasito, sendo que o *P. falciparum* é o principal causador da malária grave que pode ter um desfecho de óbito do indivíduo. Pode também tornar-se grave e complicada principalmente em indivíduos adultos não imunes, crianças e mulheres grávidas (Marsh et al, 1989).

Alguns sintomas como: convulsões, anemia intensa, hemorragias, dispnéia, vômitos sucessivos, hipotensão arterial, oligúria, icterícia e distúrbios da consciência constituem sinais clínicos alertando o possível aparecimento da malária grave (Neves et al, 2007).

Estes sintomas podem ser acompanhados de outros mais graves que podem levar ao óbito, tais como a malária cerebral, insuficiência renal aguda, febre hemoglobinúrica, edema pulmonar agudo, hipoglicemia, acidose láctica, icterícia, coagulação intravascular disseminada, hemorragia e hiperpirexia (Neves et al, 2007).

Por ser em sua maioria benigna, a malária por *P. vivax* tem sido negligenciada e, por este motivo, tem causado alguns problemas graves na saúde pública (Price et al, 2007). Atualmente, tem aumentado os estudos que demonstram que a malária por *P. vivax* tem sido erroneamente caracterizada como benigna, uma vez que há

relatos de várias casos de onde houve problemas diferentes dos convencionais causadas por este parasito, pouco estudado em relação ao *P. falciparum* (Picot et al, 2006; Lacerda et al, 2007; Lacerda et al, 2012).

Quando os indivíduos tem baixa imunidade, os riscos podem aumentar, tendo sido descritos complicações em vários níveis devido a este aspecto (Alecrim, 2000; Mendis et al, 2001).

Muitos estudos demonstram que o *P. vivax* causam dificuldades respiratórias graves, sendo que na maioria das vezes, os infectados voltam a ser saudáveis após o tratamento (Saleri et al, 2006; Kochar et al, 2005; Lawn et al, 2003) ,mas em alguns casos o paciente é levado ao óbito ou a graves sequelas (Lacerda et al, 2003; Kochar et al, 2005).

Outros estudos mais atuais mostram que o *P. vivax* pode causar falhas renais agudas e outros sintomas que podem levar o individuo ao óbito (Vermehren et al, 2005; Alexandre et al, 2010; Andrade et al, 2010).

1.2. Terapia utilizada contra a malária

Depois de feito o diagnóstico e comprovada a existência do parasito no sangue, o paciente deve receber o tratamento. Este varia de acordo com alguns quesitos tais como, idade, peso, estar gestante ou não, espécie do *Plasmodium*, suscetibilidade a doença, intensidade da doença entre outros (Ministério da Saúde, 2010).

No Brasil o Ministério da Saúde disponibiliza os medicamentos para o Sistema Único de Saúde (SUS), assim como os manuais técnicos de tratamento atualizados para a padronização do tratamento e um aumento na eficácia do mesmo, na

tentativa de evitar dosagens que possam ser tóxicas aos pacientes (Ministério da saúde 2010).

Tomando como exemplo o Brasil, de maneira geral o tratamento é dado apenas com cloroquina e primaquina em adultos e crianças com mais de 6 meses de vida contaminadas com o *P. vivax* e *P. ovale*, com exceção de gestantes e crianças até 6 meses, que recebem apenas a cloroquina; a cloroquina também é usada nas recaídas tardias (Ministério da Saúde, 2010).

No caso do *P. falciparum*, o tratamento pode se dar de várias maneiras, dependendo também do biótipo do usuário. O mais comumente usado são as combinações de artemeter e lumefantrina em 3 dias e artesunato e mefloquina também em 3 dias. Também existe um tratamento mais longo de 6 dias, onde nos 3 primeiros dias são administrados a quinina e doxicilina, seguidos de 2 dias somente de doxicilina e, por fim no 6º dia se administra a primaquina (Ministério da Saúde , 2010).

O tratamento tem como principal objetivo curar o infectado da maneira mais rápida e efetiva possível, evitando assim que o paciente possa sofrer danos maiores causados pelo parasito, disseminar a doença e não permitir a possível resistência do mesmo (OMS, 2001)

O tratamento para a malária visa atingir o parasito nas suas várias formas durante o ciclo evolutivo, seja na interrupção da esquizogônia sanguínea ou na destruição dos hipnozoítos no ciclo tecidual, não deixando que haja recaídas tardias, e/ou interrompendo a transmissão do parasito, ao eliminar as formas gametocíticas do *Plasmodium* (Ministério da Saúde, 2010).

As drogas podem agir de várias maneiras nos parasitos como, por exemplo, inibindo a formação da hemozoína, tornando o ambiente tóxico para o parasito; ou

inibindo a produção do ácido fólico, importante no metabolismo do *Plasmodium*; ou ainda podem funcionar como inibidores de transporte de elétrons mitocondriais ou da transcrição do *Plasmodium* (Cunico et al, 2008)

Estas drogas são usadas de maneira a serem administradas de acordo com a área endêmica do mundo e dos perfis imunológicos dos indivíduos, tal qual a suscetibilidade do parasito ao antimalárico (Cojean et al, 2006; Afonso et al, 2006).

Em muitas localidades do mundo os parasitas estão se tornando resistentes a medicamentos que são atualmente distribuídos pelos órgãos de saúde e usados em muitos locais indiscriminadamente (CDC, 2012).

Essa resistência tem sido associada a polimorfismos em genes do parasito como, por exemplo, o *Pfcr* que contribui para uma resistência a cloroquina e a primaquina (Cui et al, 2003; Imwong et al, 2006).

O uso racional das drogas no combate à malária tornou-se um ponto chave, pois a escolha e o uso adequado dos antimaláricos estão diretamente relacionados ao futuro das políticas de combate, à prevenção de epidemias e ao controle da morbidade e mortalidade da doença (Wongsrichanalai et al, 2002).

As combinações são importantes no tratamento. Atualmente, os derivados de artemisina são a exceção às resistências, pois diminuem rapidamente o número de parasitos no sangue e tem uma meia vida muito curta (White, 2004). A lumefantrina, que possui uma meia vida um pouco mais longa, em combinação com o artemeter, ajudam na preservação destas drogas contra a resistência do *P. falciparum* visto que uma acaba com grande parte dos parasitos e a outra elimina os remanescentes. Desta forma, este tipo de terapia combinada é mais efetiva, rápida e por isto previne recaídas.

A combinação lumefantrina+artemeter é usada hoje em dia no tratamento do *P. falciparum*, e é a única atualmente produzida como comprimido e testada clinicamente (Ridley, 2002).

Apesar de ser usada normalmente no tratamento contra o *P. falciparum*, a combinação lumefantrina + artemeter mostrou-se eficaz também contra o *P. vivax*, porém menos efetiva do que a cloroquina (Ambachew et al, 2011). Isto mostra que esta combinação pode ser uma possível saída para a resistência do *P. vivax* à cloroquina encontrada em diversos locais do mundo.

No caso de gestantes e crianças até 6 meses, pode-se administrar a quinina + clindamicina. Os derivados de artemisina só devem ser administrados na gestante caso ela corra risco de morte. Caso contrário os outros medicamentos devem ser priorizados por serem mais seguros tanto para a mãe quanto para o feto. (Ministério as Saúde, 2010; OMS, 2010).

Sendo o *P. vivax* o maior causador da malária no Brasil, e podendo causar complicações graves e até o óbito, é importante o teste de novas terapias diferentes das convencionais para tal parasito, a fim de diminuir os problemas graves possivelmente causados em decorrência destas infecções.

Da mesma forma, existe uma importância muito grande em testar terapias que possam de certa forma funcionar contra o *P. falciparum* em infecções puras ou mistas com outro *Plasmodium*.

1.3. Drogas: Artemeter , Lumefantrina e a Combinação

1.3.1.Artemisina e derivados

A artemisina (Figura 2) é um antimalárico cujo princípio ativo é retirado de uma planta chinesa (*Artemisia annua* L). Esta planta, utilizada por muito tempo na China, apresenta diversas propriedades medicinais, porém, sua ação antimalárica só foi descoberta em 1972 (Price et al, 1999).

Desde então, muitos pacientes, predominantemente nos países asiáticos, tem sido tratados com esta droga ou com algum de seus derivados, tais como o artesunato e o artemeter (Figura 2) no tratamento de malária causada pelo *P. falciparum*.

A artemisina e seus derivados pertencem à classe da lactona sesquiterpênica, uma classe que em sua formula contém uma ponte endoperóxido, sendo os únicos antimaláricos que possuem esta estrutura, que é essencial para atividade antimalárica, pois favorece sua ação sobre o parasito (Meshnick et al, 1996)

O artesunato e o artemeter são os derivados da artemisina mais utilizados atualmente. Ambos são conhecidos como sendo de primeira geração e, quando metabolizados, dão origem a diidroartemisina, que é um metabólito ativo da artemisina e seus derivados (Lin et al, 1990).

Alem de ter seu uso popularizado na Ásia, esta droga é também usada no mundo inteiro trazendo resultados satisfatórios, no entanto, ainda existe a necessidade de estudos sobre seus possíveis efeitos adversos (Qinghaosu, 1979; Wu, 2002).

Um importante aspecto é a força da artemisina e seus derivados, podendo reduzir o número de parasitos em cerca de 10.000 a cada ciclo assexuado,

diminuindo rapidamente os sintomas, mais do que qualquer outro antimalárico (White, 1997; OMS, 2010).

Uma desvantagem da artemisina e seus derivados é que estes possuem no plasma uma meia vida muito curta, disto resulta que, caso fossem administrados em monoterapia, o tempo de tratamento seria mais longo, pois o tempo não seria suficiente para eliminar todos os parasitos, o que poderia facilitar recrudescência e possíveis resistências do *Plasmodium* à droga (Menard et al, 2005). Sendo assim, uma saída para este problema, seria usar a artemisina em combinação a outras drogas (Olliaro e Taylor, 2003; Kremsner e Krishna, 2004).

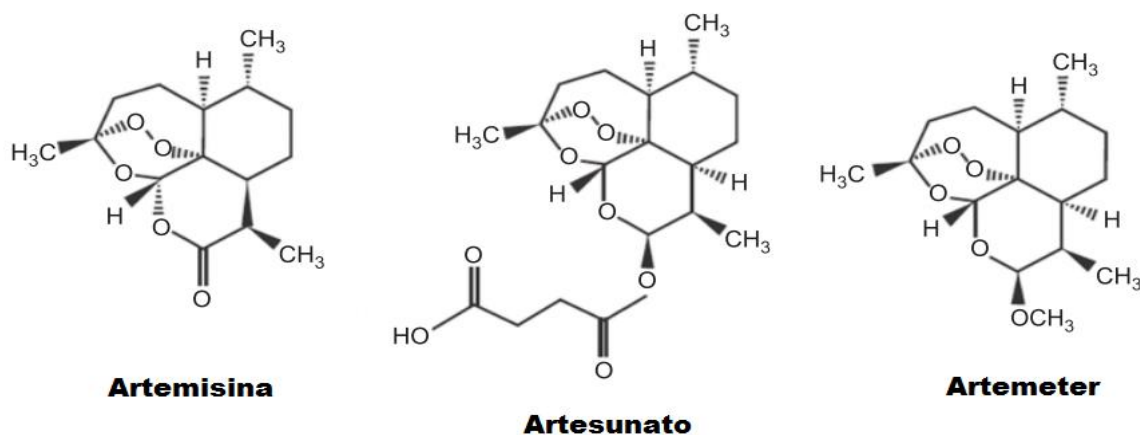


Figura 2. Estrutura química da artemisina, artesunato e artemeter

1.3.2. Lumefantrina

A lumefantrina (Figura 3), conhecida antigamente também como benflumetol é uma droga que inicialmente foi utilizada para combater a resistência do *P. falciparum* contra a cloroquina, usada convencionalmente no mundo todo.

Como outros antimaláricos (quinina, mefloquina, halofantrina), a lumefantrina pertence à família dos aril-amino-álcoois, é uma mistura racêmica de um derivado sintético do fluoreno (Ezzet et al, 2000).

No homem, a lumefantrina é metabolizada principalmente pela enzima CYP3A4, sendo produzido o metabólito desbutil-lumefantrina que possui uma atividade antiparasitária maior do que a própria lumefantrina (Kerb et al, 2009).

Leeb et al (2010) também observou que seu efeito pode ser potencializado em sinergia com outras drogas, sendo assim, seria eficaz buscar novas combinações para seu uso terapêutico.

A lumefantrina, possui uma meia vida terminal em cerca de 3 a 5 dias em indivíduos com malária. Esse período longo de atividade pode favorecer muito no tratamento e na eficácia da cura (Ezzet et al, 1998).

Uma desvantagem da lumefantrina é que sua absorção varia muito entre os indivíduos, sendo que há uma maior e melhor absorção com a ingestão junto a lipídios (White et al, 1999). Sendo assim, sua biodisponibilidade no plasma aumenta de acordo com a melhora do indivíduo acometido, que vai voltando a sua dieta normal, pois muitas vezes a malária pode trazer falta de apetite e má absorção intestinal (White et al, 1999; Ezzet et al, 2000; Ashley et al, 2007)

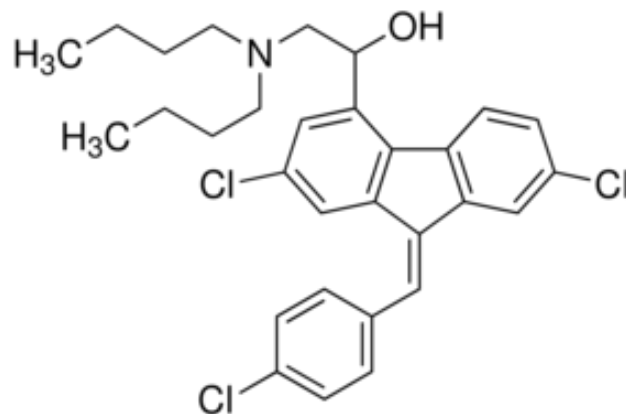


Figura 3. Estrutura química da lumefantrina

1.3.3.COARTEM® (Artemether + Lumefantrina)

Esta droga criada e registrada na China hoje é utilizada em forma associada sendo produzido sob a forma de comprimidos (Annerberg et al, 2005), sendo o mais conhecido o Coartem® da Novartis. O Coartem® é uma combinação na proporção de 1:6, onde cada comprimido contém 20mg de artemeter e 480mg de lumefantrina.

Desta maneira, a lumefantrina tem sido utilizada em combinação sempre com este derivado da artemisina tanto para melhorar e agilizar a cura, quanto para evitar que os parasitos se tornem resistentes a estas drogas (White, 1997 e 1998; OMS, 2006).

O tratamento utiliza-se de 6 doses em 3 dias, sendo que a quantidade de comprimidos por dose varia de acordo com o peso do paciente (OMS, 2010). Esta mecânica do tratamento tem se mostrado muito efetiva e com bons resultado, sendo bem tolerada em adultos e crianças, mesmo contra cepas de *Plasmodium falciparum* multi resistente às drogas (van Vugt et al, 2000; Falade et al, 2005; Hatz et al, 2008; Falade e Manyando, 2009).

Interessante ressaltar que, sem a combinação, a dosagem da lumefantrina considerada segura para os pacientes não teria força suficiente para combater totalmente o *P. falciparum* em malárias não graves em todas as suas formas no ciclo (Ezzet et al, 2000). Da mesma forma, o tratamento com o artemeter seria muito mais prolongado devido a sua meia vida ser muito curta (Menard et al, 2005).

Portanto, apesar de o tratamento ser mais caro, a lumefantrina em associação ao artemeter torna também o tratamento mais curto, ágil e eficiente. No entanto existem poucos estudos da ação desta droga no organismo humano, evitando o seu uso em mulheres grávidas ou em fase de amamentação (Cunico et al, 2008).

1.4. Modo de ação

Como já visto anteriormente, a combinação lumefantrina + artemeter é uma droga antimalárica de administração oral, facilitando a utilização e a continuidade do tratamento, visto que em terapias parenterais a rejeição é considerada maior.

Estas duas drogas distinguem-se tanto na absorção quanto na eliminação; desta forma, a combinação no comprimido único se complementam para manter a eficácia da terapia (Djimé e Lefèvre, 2009). Mostrando uma ação sinérgica, e altamente ligante as proteínas do soro facilitando a absorção pelas células (Colussi et al, 1999).

O artemeter é absorvido rapidamente após ingerido e atinge um pico de concentração plasmática em 2 horas após a ingestão. É também rapidamente hidrolisado no fígado pela enzima CYP2B6 em seu metabólito principal e ativo a Diidroartemisina (Li et al, 1998 ; White et al, 1999).

Acompanhado da rápida absorção, o artemeter age de maneira a reduzir rapidamente a biomassa de parasitos no sangue, diminuindo, também, rapidamente os sintomas clínicos da malária (White et al, 1998).

Já a lumefantrina tem uma absorção e eliminação um pouco mais lenta, tendo seu pico de absorção a partir de 3 a 4 horas, e sua eliminação em indivíduos com malária falciparum pode variar (Ezzet et al, 2000).

Esta demora faz com que haja um acúmulo da lumefantrina e um aumento na sua concentração plasmática durante o tratamento e, assim, contribui para a eliminação de parasitos residuais que possam estar em circulação mesmo após a ação do artemeter (White et al, 1999; Kokwaro et al, 2007).

A ação do artemeter no parasito é muito rápida, sendo eficaz contra quase todas as fases do *Plasmodium*, tanto assexuadas quanto sexuadas (Chen et al, 1994 ; Skinner et al, 1996). Vale ressaltar que sua ação gametocítica é importante pois, em áreas não endêmicas, pode evitar possíveis disseminações do parasito.

O modo de ação da artemisina e seus derivados assim ainda não está totalmente esclarecido, visto que existem divergências a este respeito (Olliaro et al, 2001; Haynes e Krishna, 2004; Krishna et al, 2006).

Os mecanismos propostos seriam a produção de radicais livres ou de espécies reativas de oxigênio (ROS), formados através da clivagem da ponte de endoperóxido ocorrida durante a redução do grupo heme da hemoglobina (Zhang et al, 1992). Esses radicais livres alquilam ou oxidam proteínas e lipídios dentro das hemácias infectadas com o parasito, levando-os a morte (Kannan et al, 2005).

Outro mecanismo seria a via da inibição respiratória da mitocôndria, uma vez que foi demonstrado que a artemisina e seus derivados tem atividade no transporte de elétrons na membrana da mitocondrial, favorecendo a produção de ROS (Li et al,

2005). Dois mecanismos que favorecem a produção e/ou aumento de ROS nas células.

Alguns estudos já demonstram uma modulação no estresse oxidativo do parasito, o qual reduz seus níveis de antioxidante quando tratados com artemisina e derivados (Krungkrai e Yuthavong, 1987; Meshnick, 2002).

Outras possíveis vias discutidas que possam eliminar o parasito, é a via de polimerização da hemozoína, que é um pigmento não tóxico para o parasito. Quando há algo interfere em sua polimerização, existiria toxicidade causando a morte do parasito (Sullivan et al, 1998; Cunico et al, 2008).

Já a lumefantrina, possui ação esquizonticida para todos os plasmódios humanos, e gametocida em *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malarie* (Starzengruber et al, 2007). Como o artemeter, a lumefantrina também age na formação do pigmento malárico, tendo como ação secundária a inibição da síntese protéica e ácidos nucléicos.

As duas drogas trabalham sinergicamente, havendo assim uma melhor ação sobre o parasito da malária, onde uma elimina rapidamente grande parte dos parasitos e conseqüentemente os sintomas, e a outra age posteriormente sobre parasitos remanescentes, evitando assim a recrudescência.

1.5. Mutagênese e antimaláricos

O DNA celular é alvo constante de ataques que de certa forma alteram sua composição física e química, gerando assim as chamadas mutações. Estas mutações podem se dar de maneira endógena, por falhas nas maquinarias de reparo ou pela produção de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio (ROS e RNS), ou de maneira exógena, como radiação ionizante, medicação, alimentos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) contido na fumaça, entre outros (Gaubatz, 2001; Karwatka, 2008).

Quando ocorrem estas mutações nossas células passam por “checkpoints”, e há uma verificação da célula onde detecta-se possíveis problemas. A partir daí, a célula poderá tomar 3 caminhos, a célula poderá reparar o erro no DNA, continuar a divisão de maneira errônea (problemas no “checkpoint”) ou pode ser levada a apoptose caso os erros sejam irreparáveis ou a célula não esteja mais viável (Friedbergue, 2003 e 2005). Estas lesões podem se dar como quebras nas fitas, adições de algum grupo, repetição ou deleção de nucleotídeos (Gaubatz, 2001).

Quando o sistema de reparo falha, as lesões não são reparadas corretamente, afetando assim os processos celulares básicos, como a síntese de DNA e RNA, levando, então, à formação de mutações e morte celular (Ziegler et al, 1993; Benhamou e Sarasin, 2000). Desta forma, o reparo dos danos no DNA é uma ação fundamental para a proteção do genoma (Hartwell e Weinert, 1989).

Dentre os tipos de reparos em células eucarióticas os principais são; o reparo por excisão de bases (BER) e o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) sendo esta a via mais versátil, por reconhecer vários tipos de dano ao DNA (Hanawalt et al, 2003).

Quando não reparado o dano, a célula pode então fixar este erro, caso permaneça em células germinativas poderá passar a mutação para gerações futuras, caso em outras células, se for prejudicial pode ser um início de carcinogênese.

Geralmente os danos causados no DNA que são irreparáveis levam a célula a apoptose, no intuito de minimizar possíveis danos aos tecidos, visto que neste tipo de morte a célula não são liberados resíduos celulares para o meio. Além do dano no DNA, diversos estímulos podem induzir a sinalização para a apoptose como a perturbação do citoesqueleto ou a privação de fatores de crescimento entre outros (Hengartner, 2000 ; Grivicich et al, 2007).

A apoptose pode se dar por duas vias, a via extrínseca e a via intrínseca.

A via extrínseca é desencadeada por ligações em ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana de fatores de necrose tumoral, capazes de ativar as cascatas de caspases (Budihardjo et al, 2000).

Já a via intrínseca é iniciada por estresse intra ou extracelular, onde inicia-se uma sinalização que converge para a mitocôndria (Hengartner, 2000). Quando a membrana da mitocôndria sofre colapsos, são liberadas moléculas que vão ativar as enzimas caspases e assim iniciar o mecanismo de apoptose (Grivicich et al, 2007).

As caspases são proteases que estão envolvidas na ativação do processo de apoptose. São produzidas em formas inativas denominadas pró-caspases e são ativadas somente quando a célula recebe um sinal de morte (Spanos et al, 2002). A caspase 3 é uma caspase efetora, e quando esta ativa e presente na célula, é um sinal de que a célula está em apoptose (Chang e Yang, 2000).

Um ponto relevante e também bem conhecido é que as ROS podem induzir a ativação das caspases 9 e 3, sendo caspases efetoras, induzem consequentemente a apoptose (Gottlieb et al, 2000).

O desenvolvimento de novas drogas requer estudos aprofundados, com o intuito de investigar a eficácia e a segurança destas substâncias. Os possíveis riscos avaliados devem considerar acima de tudo os benefícios do uso e os efeitos colaterais (Krishna et al, 1998).

A investigação destas drogas, respondem às perguntas necessárias sobre sua ação no DNA aos quais podem causar alterações levando ao aparecimento de mutações genéticas. Sendo assim, os estudos de mutagênese com agentes exógenos tais como fármacos, tem uma grande importância para o uso destas substâncias (Varanda, 2006).

Uma classe importante de drogas usadas atualmente são as conhecidas como antimaláricas, que são utilizadas nas terapias para o tratamento da malária, enfermidade esta que é de grande importância na saúde pública.

Poucos são os estudos sobre os efeitos mutagênicos e genotóxicos destas drogas que são usadas no mundo inteiro, além do que, ainda existem drogas antimaláricas cujo os efeitos a níveis moleculares ainda são desconhecidos

Em relação a estas drogas o artemeter, um derivado da artemisina, e a lumefantrina que é da classe dos aril-amino álcool, assim como a mefloquina, halofantrina e o quinino, são usadas em larga escala, e seus efeitos mutagênicos e genotóxicos ainda não estão completamente explicados.

Mota et al (2011) demonstra que o artesunato pode causar danos mutagênicos e genotóxicos em linfócitos humanos, efeito que o autor atribui à geração de ROS, normal nestas drogas que contém ponte endoperoxítica.

Já Efferth e Kaina (2010) descreveram efeitos apoptóticos causados a artemisina e seus derivados como o artesunato, sendo a apoptose uma via de morte normal causada pelo artesunato.

Alguns outros estudos como de Price et al (1999), Navaratnam et al (2000), Mohammad et al (2008), Raymond e Donald (2008), Li e Hickman (2011) e muitos outros, comentam sobre os aspectos neurotóxicos causados por elevadas concentrações de artemisina ou algum de seus derivados no soro.

Foley e Tilley (1998) sugerem varias ações destas drogas, sendo uma interessante para o estudo a interação da droga com o DNA, impedindo a síntese de RNA e a replicação do DNA e assim levando a morte do parasito.

Por outro lado, Münzner e Renner (1982) após avaliar a mutagênicidade do quinino através do teste de Ames, e, dos ensaios de troca de cromátides irmãs, aberrações cromossômicas e micronúcleo, puderam constatar que o quinino mesmo em doses superiores as utilizadas em tratamentos convencionais da malária, apresentaram um potencial mutagênico muito fraco.

Os efeitos mutagênicos da mefloquina são desconhecidos; no entanto, por ser uma droga de excreção tardia é possível que haja danos celulares e consequentemente no DNA por possíveis acúmulos da droga ou de seus metabolitos. Sua ação no parasito tem enorme semelhança com a ação do quinino, mas diferentemente a mefloquina não se interpões no DNA (Goodman e Gilmar 2007).

Milatovic et al (2011), demonstrou que a mefloquina também eleva o estresse oxidativo em células neurais de ratos, aumentando também os níveis de apoptose apresentando um efeito concentração-dependente.

Akerele e Obaseike-Ebor (2002) demonstraram que a mefloquina não apresenta efeito mutagênico e não tem potencial genotóxico nas concentrações testadas em seu trabalho, no entanto a droga mostrou efeitos citotóxicos dose-dependente.

Em testes com animais, foi verificado que a mefloquina pode causar danos no DNA em células germinativas, podendo assim ter efeitos em gerações futuras (Palmer et al, 1993 ; Howard, 1996 ; El-Habit e Al-Khamash, 2011).

A halofantrina, outro antimalárico utilizado, tem sido evitado nos tratamentos por se mostrar cardiotoxico (Nosten et al, 1993; Touze et al, 2002 ; White, 2007) .

Outros trabalhos como de Obi et al (2004) , Nwanjo et al (2007) , Adaramoye et al (2008) entre outros, mostram um efeito hepatotóxico causado por doses elevadas da halofantrina em animais.

No entanto, não foram encontrados efeitos mutagênicos e genotóxicos importantes na administração da halofantrina.

Em muitos locais do mundo, o *Plasmodium* tem se tornado resistente cada vez mais às drogas usadas no tratamento da malária. Esta resistência sugere que alterações no DNA desses parasitos estão acontecendo rapidamente e em larga escala (Cowman et al, 1994; Nosten e White, 2007; Uhlemann et al, 2007).

Já é comumente conhecido que agentes exógenos tais como as drogas utilizadas no tratamento de malária podem acelerar e facilitar o mecanismo de mutagênese.

Tendo em vista que algumas drogas possam aumentar a quantidade de mutações no DNA dos parasitos, caráter este visto pelo grande numero de cepas resistentes a estas drogas nos trabalhos acima citados, pode-se sugerir que o

mesmo possa ocorrer no DNA de células humanas e consequentemente podendo levar ao desenvolvimento de doenças genéticas tais como o câncer.

Desta forma, é de vital importância, efetuar testes relacionados à mutagênese para estas drogas, a fim de fornecer dados para a literatura que possam aumentar o conhecimento dos possíveis efeitos adversos destes medicamentos para um uso seguro.

Importante também o estímulo de estudos para outras possíveis utilidades destas drogas, como por exemplo a aplicação em terapias contra o câncer. Visto que muitos estudos relatam a ação do antimalárico artemisina e seus derivados contra células cancerosas (Chen et al, 2003; Singh e Lai, 2004; Lai et al, 2005; Nam et al, 2006).

Testes importantes para verificar possíveis danos no DNA causados por certas drogas são os testes de mutagenicidade e genotoxicidade como o ensaio cometa e o teste do micronúcleo.

O ensaio cometa fornece dados sobre o efeito genotóxico da substância teste, mostrando os danos causados em um curto intervalo de tempo e que não são reparados pela célula. O ensaio feito após 3h de tratamento, não permite que as células passem por todas as fases de seu ciclo e consequentemente não tenham tempo de reparar os danos pelos mecanismos de reparo do DNA. Assim pode se observar as quebras que ocorreram no DNA devido ao uso da substância podendo ser analisados os níveis por parâmetros como o *“tail moment”* (TM) (Figura 4) que com auxílio de softwares calcula a porcentagem de DNA na cauda do cometa X o tamanho da mesma.

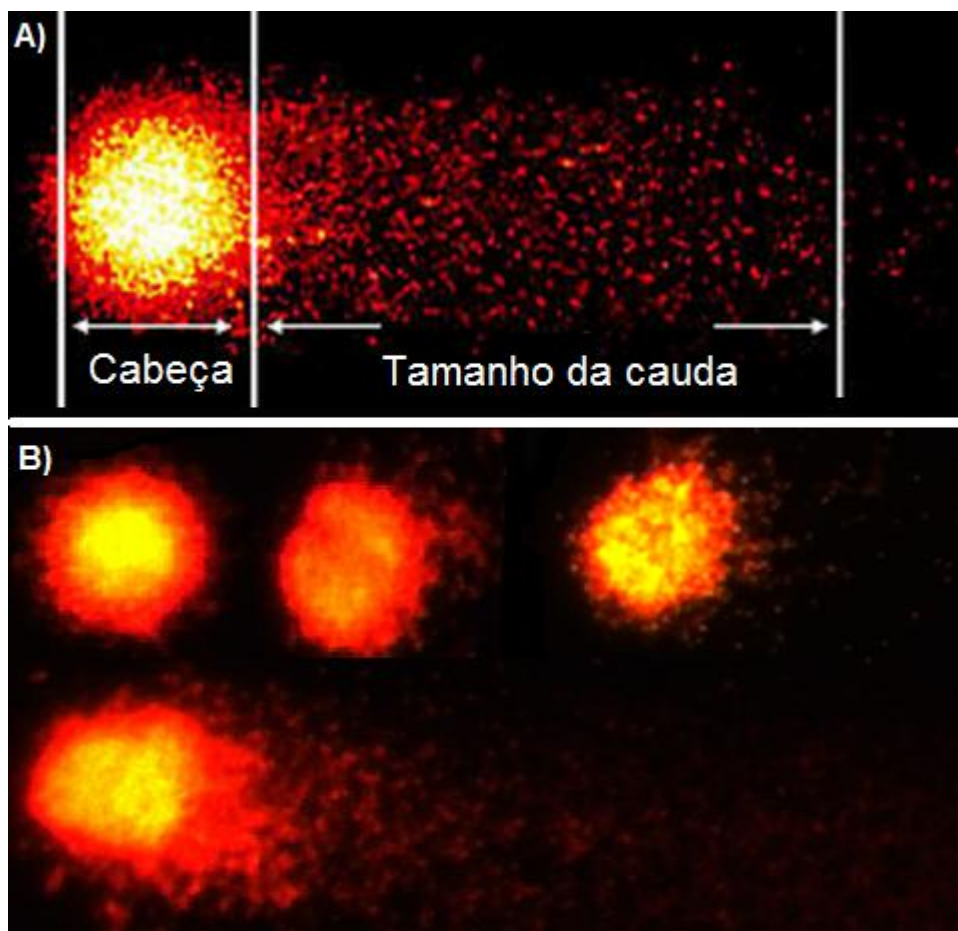


Figura 4. Representação do ensaio genotóxico onde em A) as regiões do cometa e em B) os níveis de dano no DNA representado pelos diferentes tamanhos da cauda do cometa.

A técnica do micronúcleo é um utilizado para avaliar vários tipos de danos no DNA em nível cromossômico (clastogênicos ou aneugênicos), sendo uma ferramenta importante nas informações do potencial mutagênico de agentes físicos, químicos e biológicos (Fenech, 2000; Heddle et al, 2010).

Os micronúcleos (MN) são corpos esféricos (pequenos núcleos), encontrados no citoplasma com forma e coloração semelhante ao do núcleo principal (Figura 5), formados durante a telófase da mitose ou meiose, quando a membrana nuclear é reconstituída ao redor dos cromossomos das células filhas. São resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou por algum cromossomo inteiro que não se juntou ao núcleo principal ao final da anáfase (Fenech, 2000; Fenech, 2006).

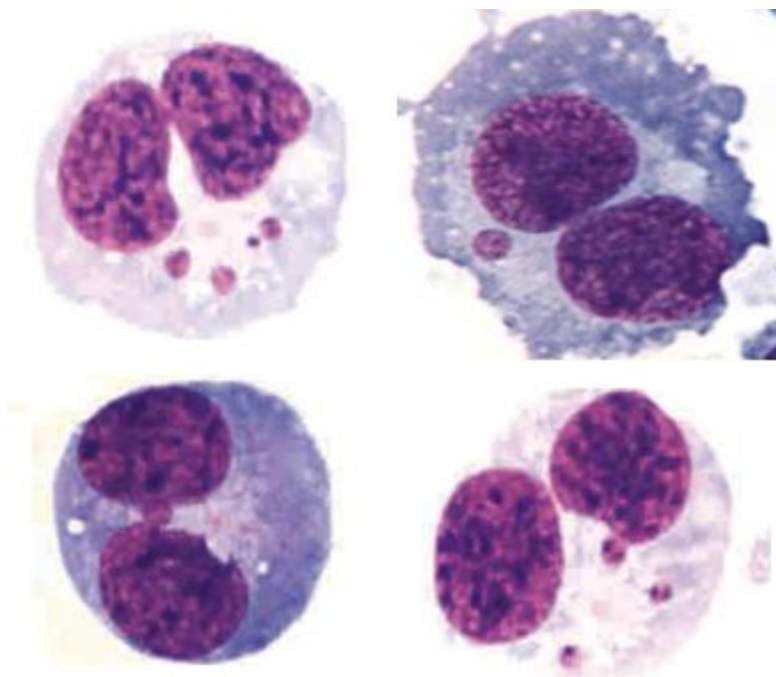


Figura 5. Linfócitos binucleados contendo um ou mais micronúcleos, adaptado Fenech, 2003.

No entanto, o MN representa a perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou dano no aparelho mitótico que ocorre durante o ciclo celular. Por isso, os danos no DNA causados, por exemplo, pela exposição a agentes mutagênicos, somente serão expressos em MN após passarem por pelo menos um ciclo de divisão celular (Fenech, 2000).

Um segundo parâmetro analisado no teste do micronúcleo, são os brotos celulares (Figura 6). Sua origem é desconhecida, sendo que alguns autores sugerem que poderiam resultar de amplificação gênica será expulsa do núcleo principal formando estruturas semelhantes aos MN, com a diferença de estarem ligadas ao núcleo principal). Esta amplificação, assim como os MN, pode ocorrer devido a efeitos mutagênicos de algumas substâncias (Fenech et al, 2011).

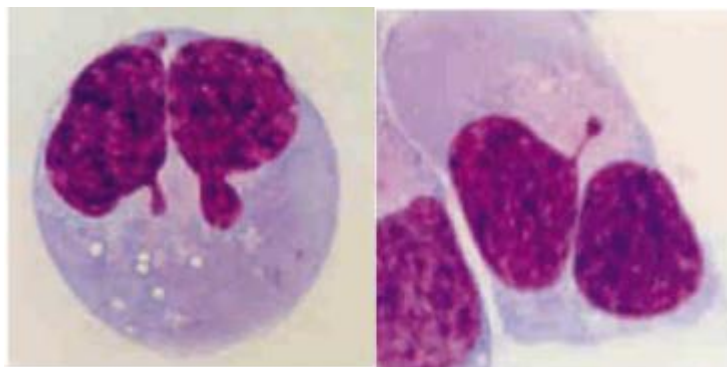


Figura 6. Linfócitos binucleados apresentando brotos nucleares, adaptado Fenech, 2003.

As pontes nucleoplasmáticas (Figura 7) são formadas pela presença de cromossomos dicêntricos. Durante a telófase, os cromossomos são puxados para os pólos opostos, e quando um cromossomo dicêntrico está presente, este é puxado para os dois lados simultaneamente formando uma estrutura que liga os dois núcleos filhos (Fenech et al 2011). Estudos revelam que as PNPs são encontradas em algumas síndromes genéticas tal como a síndrome de Bloom e a anemia de Fanconi (Chan et al, 2007 ; Naim e Rosselli, 2009).

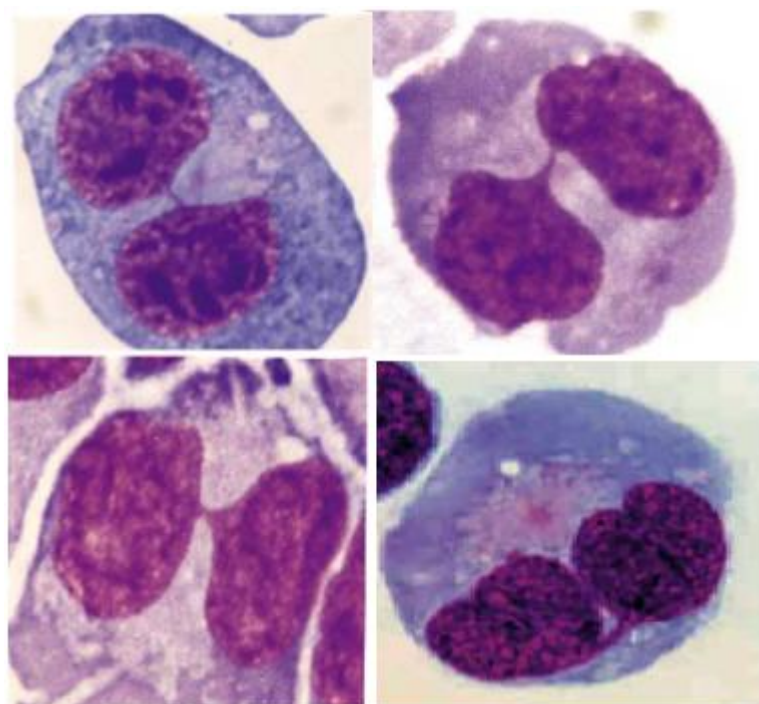


Figura 7. Linfócitos binucleados apresentando pontes nucleoplasmáticas, adaptado Fenech, 2003.

A citocalasina -B impede que ocorra a citocinese nas células, permitindo apenas que ocorra a divisão nuclear e não a divisão celular. Por este motivo é possível ver células com um, dois, três, quatro ou mais núcleos (Figura 8), nos indicando quantas vezes aquela célula passou por uma divisão nuclear (Fenech et al, 2002).

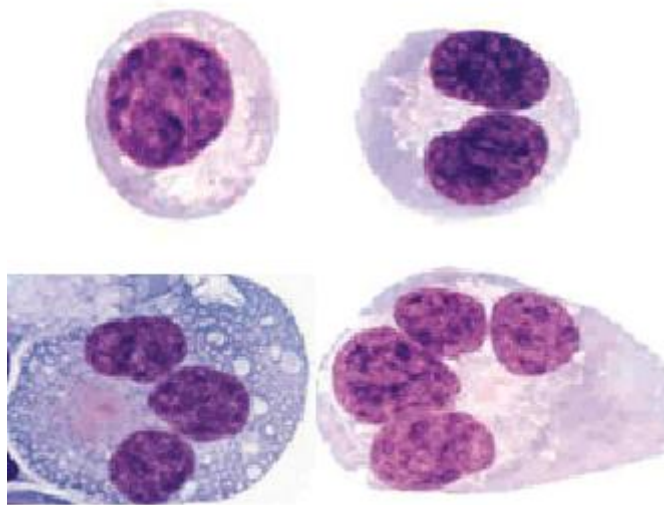


Figura 8. Linfócitos apresentando um, dois, três e quatro núcleos após a divisão celular na presença de citocalasina -B, adaptado Fenech, 2003.

Muitos são os testes que podem ser feitos para verificar possíveis danos causados por alguma droga e dessa forma demonstrar a segurança de seu uso.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial mutagênico, genotóxico, e apoptótico da droga antimalárica lumefantrina, assim como sua combinação com o artemeter em diferentes concentrações em leucócitos humanos;

2.2. Objetivos específicos

- 1- Detectar a frequência de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares em leucócitos humanos tratados com diferentes concentrações de lumefantrina, e sua combinação com o Artemeter;
- 2- Verificar possíveis efeitos citotóxicos e citostáticos por diferentes concentrações de lumefantrina e sua combinação com o artemeter;
- 3- Avaliar os danos genotóxicos causados por diferentes concentrações de lumefantrina e sua combinação com o artemeter;
- 4- Verificar uma possível indução de apoptose causada por diferentes concentrações de lumefantrina e sua combinação com o artemeter;
- 5- Verificar possíveis diferenças de genotoxicidade e mutagenicidade entre a droga lumefantrina pura e combinada com o artemeter.

3. Material e Métodos

3.1. Cultura de células

Foram colhidas amostras de sangue periférico total de 8 doadores saudáveis (4 para teste da droga lumefantrina e 4 para teste com a combinação lumefantrina + artemeter) sendo dois do sexo masculino e dois do sexo feminino, com idade acima de 18 e abaixo de 30 anos, não submetidos a radiografias recentes, que não utilizam ou utilizaram medicamentos nem contraíram algum tipo de enfermidade, que não foram expostos a agentes mutagênicos, não são usuários de bebidas alcoólicas e de tabaco, não utilizaram suplementos alimentares e hormônios. Estes dados foram colhidos mediante questionário oral. Os procedimentos foram efetuados após os doadores terem assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado no Comitê de Ética do Hospital Universitário Julio Muller, sob o número 993/CEP-HUJM/2011.

Para as culturas foram utilizados 500 μ L de sangue total semeadas em meio RPMI 1640 78%, com pH 7,0 (Sigma), suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado (Gibco) e 2% de fitohemaglutinina A (Cultilab) acrescidos de dos antibióticos penicilina (Sigma) 5 mg 10x10⁶ U e estreptomicina (Sigma) 10 mg/L. Foram feitas 6 culturas para cada amostra de lumefantrina e 9 para a combinação lumefantrina + artemeter onde foram armazenadas em garrafas de cultura em estufa B.O.D a 37°C por 96h.

3.2. Escolha das concentrações das drogas para os testes

As culturas foram tratadas com lumefantrina ($C_{30}H_{32}Cl_3NO$, peso molecular 528,94; Sigma) somente, ou com a combinação lumefantrina + artemeter. A escolha das concentrações de lumefantrina a serem testadas foi feita através do protocolo 487 da OECD que sugere inicialmente uma concentração que possa atingir o C.I 50 (concentração inibitória 50%), sendo aplicado o tratamento de exposição prolongada sem troca do meio de cultura e sem uso da enzima S9. Ao fim do teste seria calculado o índice de proliferação e bloqueio da citocinese (CBPI) pela fórmula:

$$CBPI = \frac{(\text{N}^\circ. \text{Células mononucleadas}) + (2 \times \text{N}^\circ. \text{Células binucleadas}) + (3 \times \text{N}^\circ. \text{Células multinucleadas})}{(\text{N}^\circ. \text{total de Células})}$$

E aplicado na fórmula de citostase:

$$\% \text{Citostase} = 100 - 100\{ (CBPI_r - 1) / (CBPI_c - 1) \}$$

Como para alcançar o C.I 50 à concentração de solvente excedia o limite máximo indicado para testes mutagênicos, à concentração então a ser testada era aquela no qual a concentração do solvente (DMSO) que a droga foi diluída ficasse no limite máximo (2%) para teste mutagênicos. Neste caso de 100µg/mL; a partir desta foram testadas também outras duas concentrações inferiores, sendo, 80 e 60µg/mL. Assim foram tratadas da seguinte forma:

C100 = 100µg/mL de lumefantrina

C80 = 80µg/mL de lumefantrina

C60 = 60µg/mL de lumefantrina

Para o tratamento combinado; com base nos resultados obtidos no teste mutagênico para a lumefantrina, foram selecionadas as concentrações desta droga a serem combinadas com o artemeter ($C_{16}H_{26}O_5$, peso molecular 298,37 ; Sigma), optando-se por manter nessas combinações a mesma proporção entre as drogas usada no tratamento da malária (1 parte de artemeter + 6 partes de lumefantrina, 1:6). Foram incluídos também combinações com concentrações de artemeter + lumefantrina próximas às observadas no plasma dos pacientes com malária após o tratamento com o Coartem® (Navaratnan et al, 1995; Mansor et al, 1996; Shi et al, 2006; Ashley et al, 2007; Hatz et al, 2008).

Como a maior concentração C100 já possuía o limite de solvente permitido, este tratamento então foi retirado para não exceder o limite quando combinado com o artemeter que foi também diluído no mesmo tipo de solvente (DMSO).

Sendo assim, para o tratamento combinado foram utilizadas as concentrações de lumefantrina + artemeter respectivamente:

C80+ = 80 + 13,34 µg/mL

C60+ = 60 + 10 µg/mL

C30+ = 30 + 5 µg/mL

C9+ = 9 + 1,5 µg/mL

C6+ = 6 + 1 µg/mL

Em todos os experimentos foram utilizados um controle negativo (CN, sem nenhuma substância), um controle de solvente (CS, DMSO a 2%) e um controle positivo (CP, Doxorubicina a 0,03µg/mL)

Nos testes combinados, a nomenclatura dos controles foram adicionados o símbolo “+” (CN+, CS+ e CP+) para diferenciar dos testes com a droga lumefantrina pura.

3.3. Teste do Micronúcleo

Após 48h de cultivo celular, foi adicionada às culturas a Citocalasina-B (Sigma) na concentração final de 6µg/mL para a obtenção das células binucleadas, assim como a lumefantrina, a doxorubicina(Eurofarma) e o DMSO nas concentrações acima descritas. Ao final da incubação, as culturas foram colocadas em tubos tipo cônicos de 15mL e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e foram acrescentados 3mL de citrato de sódio (1%) a 4°C e as células foram ressuspensas. Após 10s de hipotonização, foram acrescentados 5mL de fixador a 4°C (3:1 metanol/ácido acético) e 4 gotas de formaldeído a 37% novamente, as células foram ressuspensas e centrifugadas a 1000 rpm por 5 min. O processo de fixação foi repetido por mais duas vezes. Ao final, o sobrenadante foi descartado deixando-se sobrenadante de 0,5mL, as células foram ressuspensas e gotejadas em lâminas limpas e geladas, previamente armazenadas em água destilada. Após a secagem das lâminas, em temperatura ambiente, as mesmas foram coradas com Giemsa (Merck) a 5% dissolvido em tampão Sörensen (Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 a 0,06M, pH 6,8) na proporção 1:20 por 7min.

A análise de micronúcleos foi feita em microscópio de luz de transmissão (*Nikon*). Foram analisadas 1000 binucleadas células por cultura quanto à presença de micronúcleo, brotos nucleares e pontes citoplasmáticas. Foram considerados como micronúcleos os fragmentos com tamanho entre 1/16 e 1/3 dos núcleos principais, com coloração semelhante à coloração dos núcleos principais, sem emissão de refringência e sem sobreposição a qualquer um dos núcleos principais.

Foram classificados como brotos nucleares os micronúcleos ligados ao núcleo e como pontes citoplasmáticas a ligação entre os dois núcleos principais (Fenech et al, 2003).

Para a obtenção do Índice de Divisão Nuclear (IDN) considerou-se a frequência de células mono, bi, tri e tetranucleares numa população de 500 células analisadas.

O IDN é dado pela seguinte fórmula:

$$\text{IDN} = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / N, \text{ onde:}$$

M1 – M4: número de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente

N: número total de células viáveis.

A partir daí, pode-se calcular o índice de divisão nuclear, que nos mostra se houve ou não efeito citostático (diminuindo a divisão nuclear ou tornando-a mais lenta).

3.4. Ensaio Cometa

Após 48h de cultivo celular, foram adicionada às culturas a droga pura ou em combinação, a doxorrubicina e o DMSO nas concentrações anteriormente descritas. Passados 3h, foram retiradas alíquotas de 200µL das culturas. 15µL da cultura foram misturados com igual quantidade de azul de Tripan para o teste de viabilidade celular, admitindo-se o prosseguimento do ensaio cometa somente em condições de mais de 70% de viabilidade celular.

Foram adicionados 100µL da cultura a 300µL de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% e, após a homogeneização, a mistura foi colocada sobre uma lâmina previamente preparada com uma fina camada de agarose de ponto de fusão normal a 1,5%. O material foi coberto com lamínula (previamente limpa em álcool 98%) e

resfriado a 8°C por 5 minutos. Em seguida a lâminula foi retirada cuidadosamente a fim de manter a camada do homogeneizado preso a lâmina com agarose de ponto de fusão normal, e a lâmina foi introduzida em cuba com solução de lise a 4°C (NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton X-100 1% e DMSO 10%, pH 10,0), protegida da luz e sendo mantida em geladeira durante até uma semana.

As lâminas foram colocadas em uma cuba de vidro contendo tampão de eletroforese com pH alcalino (NaOH 0,3 M e Na₂EDTA 1 mM, pH > 13) a 4°C, e incubadas na mesma temperatura durante 20 minutos. Em seguida, foram transferidas para a cuba de eletroforese e submetidas a uma corrente de 25V e, 300 mA por mais 25 minutos, a 4 °C. As lâminas foram lavadas com tampão de neutralização (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5) por três vezes e fixadas em etanol absoluto por alguns segundos. Para a visualização dos cometas, a coloração foi feita com 50µL de Gel Red (Uniscience, 1µL de Gel red estoque para 1 mL de H₂O destilada). Foram capturadas 100 células por indivíduo, para cada tratamento, utilizando um microscópio de epifluorescência, (filtro 516-560 nm, barreira de filtro de 590 nm, aumento total de 400x). As imagens dos cometas foram capturadas aleatoriamente e analisado o parâmetro “Tail Moment” (TM) utilizando o software CometScore (TriTek Corp, 2003 - download livre no endereço www.autocomet.com). O TM é um parâmetro que analisa a % de DNA na cauda multiplicada pelo tamanho da mesma, isso baseado no numero de pixels dos fragmentos de DNA que são vistos pela microscopia de fluorescência e avaliado pelo software.

3.5. Separação de linfócitos por gradiente de densidade para os testes de necrose e apoptose

Foram coletados 15 mL de sangue periférico total em tubo heparinizado de três doadores saudáveis nos mesmos parâmetros utilizados para os testes anteriores, sendo que neste caso foram utilizadas duas mulheres e um homem.

O sangue foi misturado na mesma quantidade com salina estéril filtrada em millipore de 0,22 μ m , totalizando 30 mL de solução.

Em 3 tubos cônicos de 15mL, foram colocados 5ml de histopaque 1077 (Sigma) previamente filtrado e em temperatura ambiente, e adicionado cuidadosamente 10mL da mistura de sangue + salina em cada um.

Foi centrifugado a 1000 rpm por 30 minutos a fim de separa pelo gradiente de densidade.

Foi retirada a camada leucocitária e colocada em outro tubo cônico estéril, a mistura foi lavada com salina estéril, onde foi adicionado 12mL de salina , ressuspendeu-se o tubo e colocou em centrifuga a 1000 rpm por 15 minutos , o procedimento foi efetuado duas vezes.

O sobrenadante foi retirado deixando 1mL de salina, as células foram ressuspendidas e colocadas em cultura conforme descrito anteriormente.

O tratamento foi realizado 24h após o cultivo, nas concentrações anteriormente descritas. As células foram analisadas nos tempos de 0, 24, 48 e 72h de tratamento.

Foi feito também teste de 1 indivíduo em 0, 6, 12 e 24h.

3.6. Teste de Apoptose para de detecção de caspase-3 ativa

Para o teste de apoptose foi utilizado o kit *NucViewtm 488 Caspase-3 Assay Kit for Live Cells*, conforme as instruções do fabricante. Este kit possui um substrato de caspase 3 ligado a um corante de DNA que quando em presença de caspase 3 ativa, este é clivado e libera o corante que penetra a membrana, liga-se ao DNA e emite fluorescência verde que pode ser vista em microscópio de epifluorescência. O kit funciona em células intactas e não influencia ou inibe a progressão da apoptose. Basicamente, em cada tempo foi retirado 400µL da cultura celular, e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e as células foram ressuspensas com 70µL de PBS 1x + 2 µL do substrato NucView para caspase-3. As células foram incubadas em temperatura ambiente por 45 minutos, no escuro. A suspensão foi centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos e ressuspensa com 20µL de PBS 1x + 2µL de DAPI (100µM), transferida para a lâmina e coberta com lamínula. A observação foi feita em microscópio de epifluorescência (Nikon), com filtros excitação/emissão: 485/515 nm e excitação/emissão: 346/460 nm. Onde foram analisadas 500 células por indivíduo/por tratamento, sendo classificadas como apoptóticas aquelas coradas em verde (ou seja, com caspase 3 ativa) e como não apoptótica aquelas coradas em azul.

3.7. Teste de Necrose

Foi feito um teste de necrose em amostra de 1 doador para verificar esta via de morte celular.

Após separar os leucócitos e colocar em cultura como descrito acima, as culturas foram tratadas com as concentrações descritas para C100, C80, C60, e C30, além dos controles CP, CN e CS. Foram retirados 400µL da suspensão celular nos

tempos de 0, 6, 12 e 24hs. Foram preparadas soluções dos corantes que diluiu-se, Iodeto de Propídio (PI, Sigma) 1mg/mL de água destilada e deionizada, Diacetato de Fluorescência (DAF, Sigma) 1,5mg/mL de DMSO e Hoechst 33342 (HO, Sigma) 1mg/mL de água destilada e deionizada. Da solução dos corantes foram misturados 25% de PI + 50% de DAF +10% HO+ 15% de PBS formando uma nova solução.

As células foram retiradas das culturas nos tempos acima e misturadas com 0,8µL da mistura de corantes, as células foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. A observação foi feita em microscópio de epifluorescência (Nikon) com filtros excitação/emissão: 485/515 nm e excitação/emissão: 346/460 nm.

Foram analisadas 500 células por tempo/tratamento, sendo classificadas azuis as células normais e vermelhas as células necróticas.

3.8. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos a teste de normalidade e, em seguida, a Análise de Variância (ANOVA – one way) para dados paramétricos, seguido do pós-teste de Bonferroni. Para comparar os resultados obtidos no tratamento com a lumefantrina pura e da combinação com o artemeter nas concentrações de C80 x C80+, e C60 x C60+ foi utilizado o teste t de student

Foi utilizado o software brasileiro BIOSTAT 5.0 (Ayres et al, 2007) utilizando-se os níveis de significância de 1% e 5% em todos os testes realizados.

4. Resultados

4.1 Ensaio Cometa

4.1.1. “Tail Moment” (TM)

A lumefantrina causou um aumento significativo ($p < 0.01$) no dano genotóxico em todas as concentrações testadas, C100, C80 e C60 em comparação com o CS (Figura 9; Tabela 1).

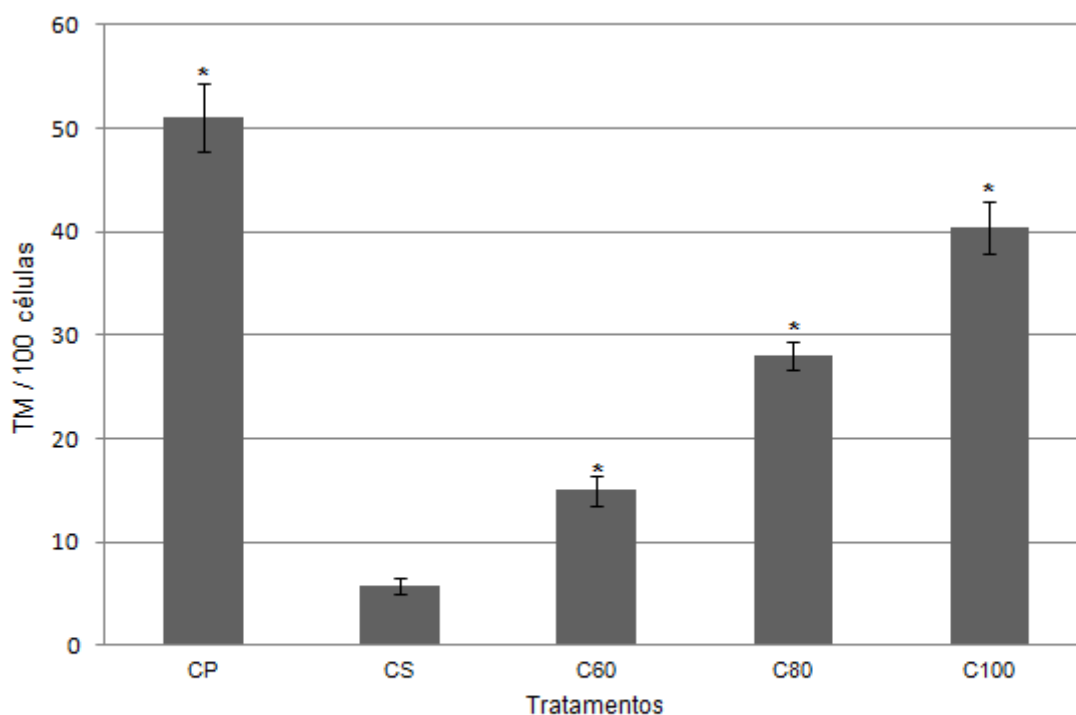


Figura 9. Dano genotóxico em linfócitos T em resposta aos diferentes tratamentos com a droga lumefantrina após 3h de tratamento, * $p < 0,01$ (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).

O tratamento combinado elevou significativamente o TM ($p < 0.01$) nas concentrações; C80+ e C60+ em relação ao CS+, o que não foi verificado para concentração C30+ (Figura 10; Tabela 2).

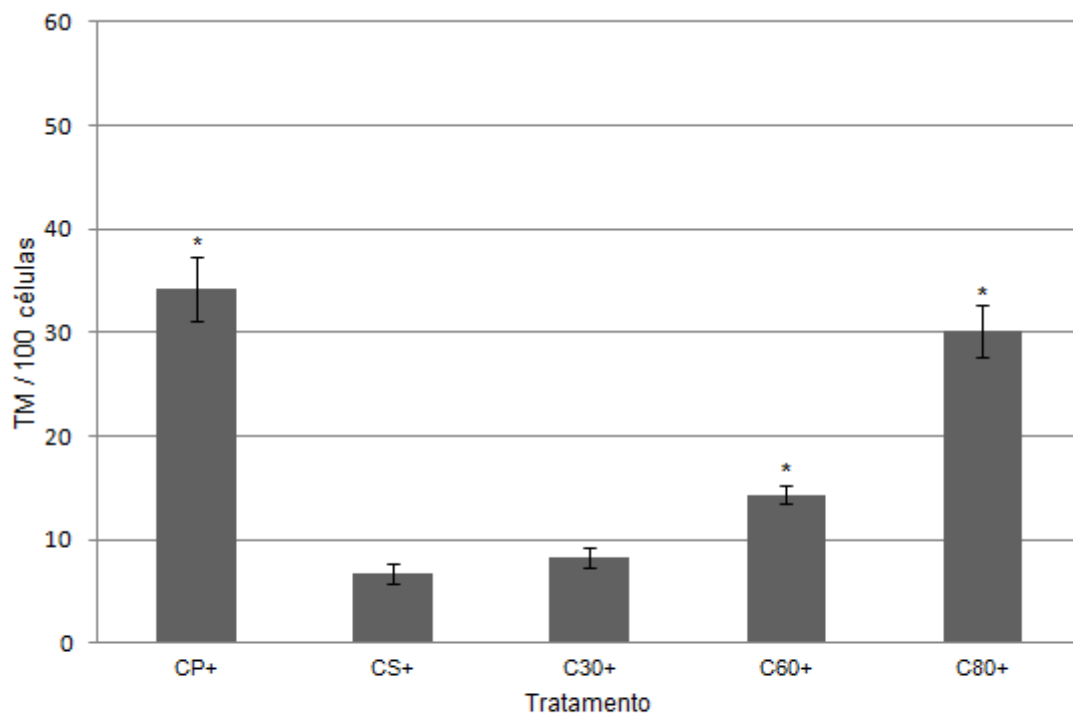


Figura 10. Dano genotóxico em linfócitos T em resposta aos diferentes tratamentos com a combinação das drogas lumefantrina + artemeter (6:1) após 3h de tratamento, * $p < 0,01$ (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).

4.2. Teste do Micronúcleo

4.2.1. Micronúcleos (MN)

A lumefantrina, aumentou o número de MN nas concentrações C100, C80 e C60 em relação ao CS (Figura 11; Tabela 1).

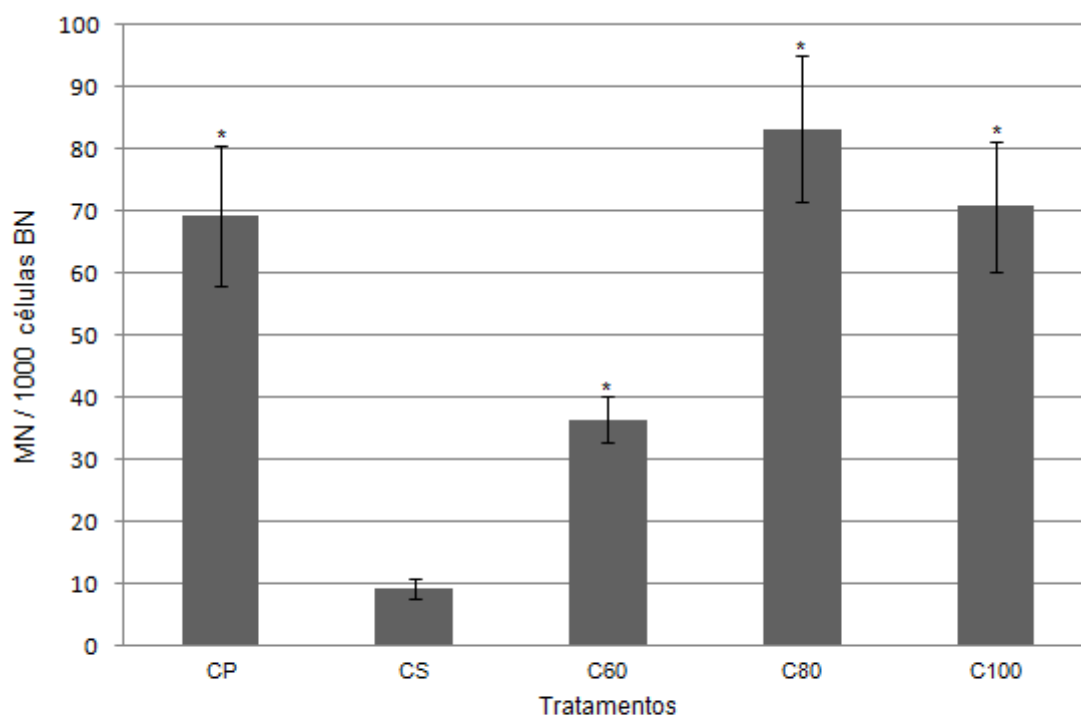


Figura 11. Micronúcleos (MN) em 1000 células binucleadas (BN) nos diferentes tratamentos com a droga lumefantrina após 48h de tratamento, * $p < 0,01$ (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).

Quando a droga foi combinada com o artemeter, pode-se observar um aumento significativo ($p < 0.01$) no número de MN nas combinações C80+ e C60+ em relação ao CS+. Apesar de ter ocorrido um aumento sutil em C30+, C9+ e C6+, esse não se mostrou significativo em relação ao CS+ (Figura 12; Tabela 2).

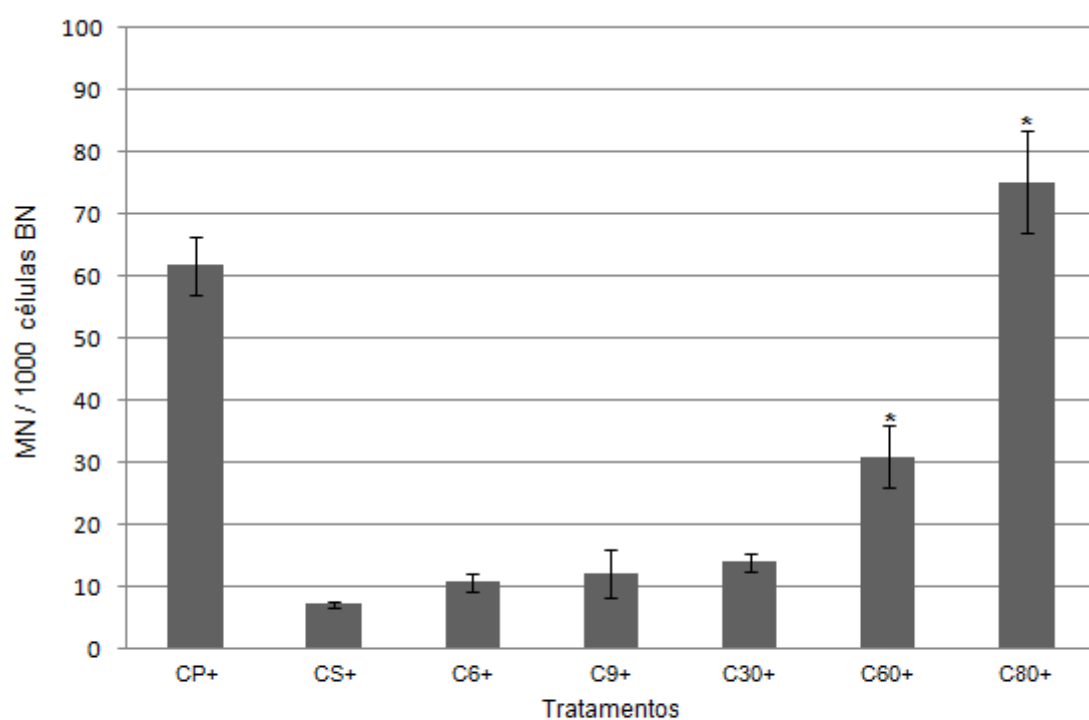


Figura 12. Micronúcleos (MN) em 1000 células binucleadas (BN) nos diferentes tratamentos com a combinação das drogas lumefantrina + artemeter após 48h de tratamento, * $p < 0,01$ (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).

4.2.2. Brotos Nucleares (BrN)

A lumefantrina aumentou significativamente ($p < 0.01$) o número de BrN nas concentrações C100, C80 e C60 em relação ao CS (Figura 13; Tabela 1).

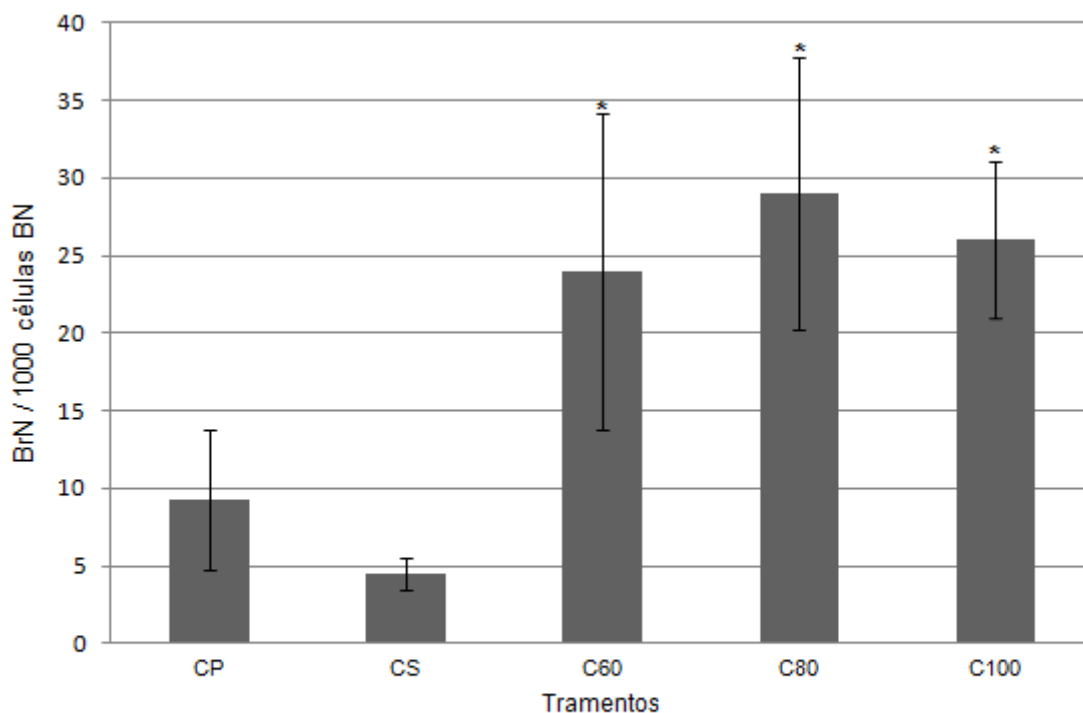


Figura 13. Brotos nucleares (BrN) em 1000 células binucleadas (BN) nos diferentes tratamentos com a droga lumefantrina após 48h de tratamento, * $p < 0,01$ (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).

Os tratamentos combinados C80+ e C60+, também elevaram o número de BrN em relação ao CS+, o que não foi visto para os tratamentos C30+, C9+ e C6+ (Figura 14; Tabela 2).

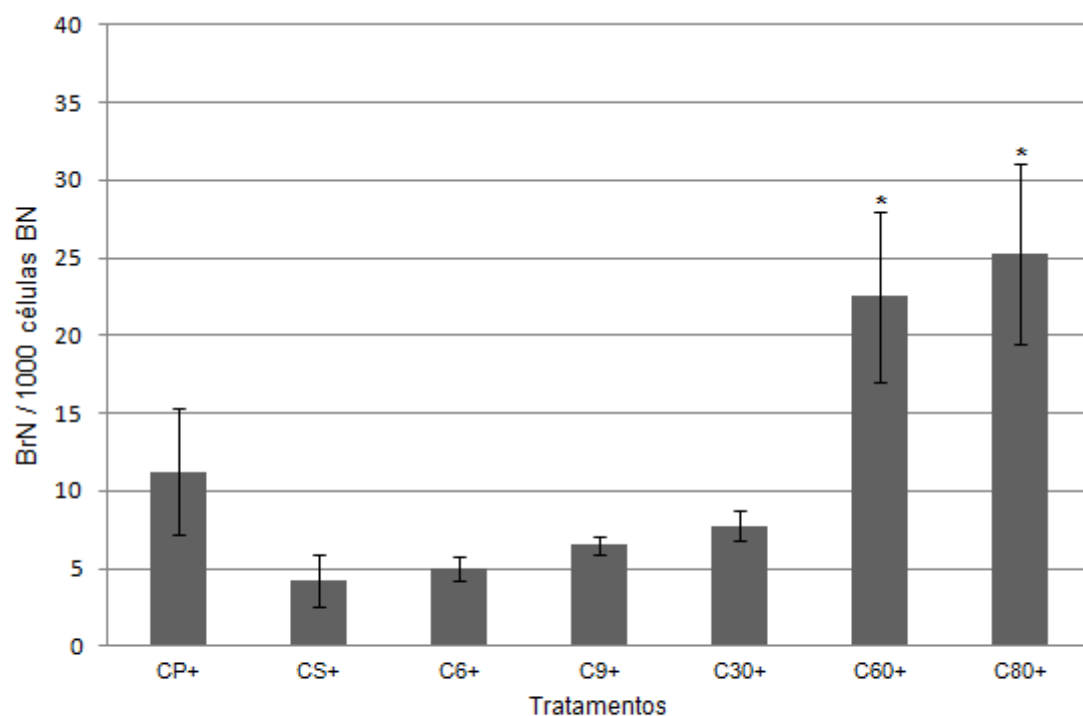


Figura 14. Brotos nucleares (BrN) em 1000 células binucleadas (BN) nos diferentes tratamentos com a combinação das drogas lumefantrina + artemeter após 48h de tratamento, * $p < 0,01$ (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).

4.2.3. Pontes Nucleoplasmáticas (PNP)

No presente estudo não foi detectada nenhuma alteração significativa ($p < 0.05$) em relação a quantidade de PNPs nos tratamentos testados com a lumefantrina (Figura 15), nem com sua combinação com o artemeter (Figura 16).

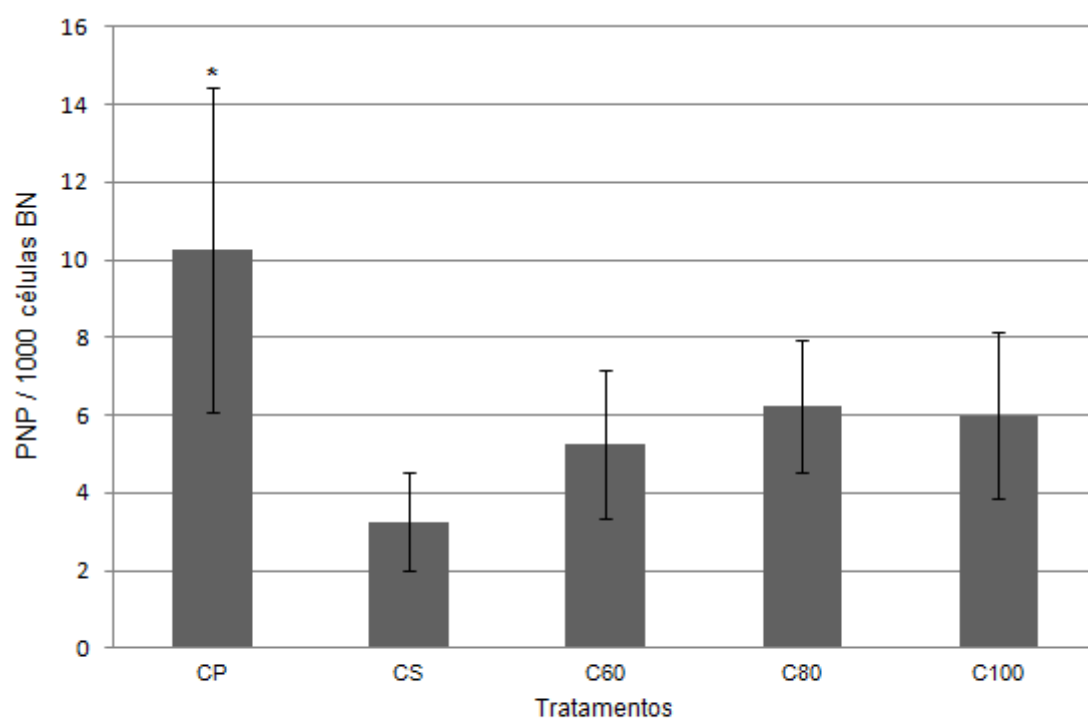


Figura 15. Pontes nucleoplasmáticas (PNP) em 1000 células binucleadas (BN) nos diferentes tratamentos com a droga lumefantrina após 48h de tratamento, * $p < 0,01$ (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).

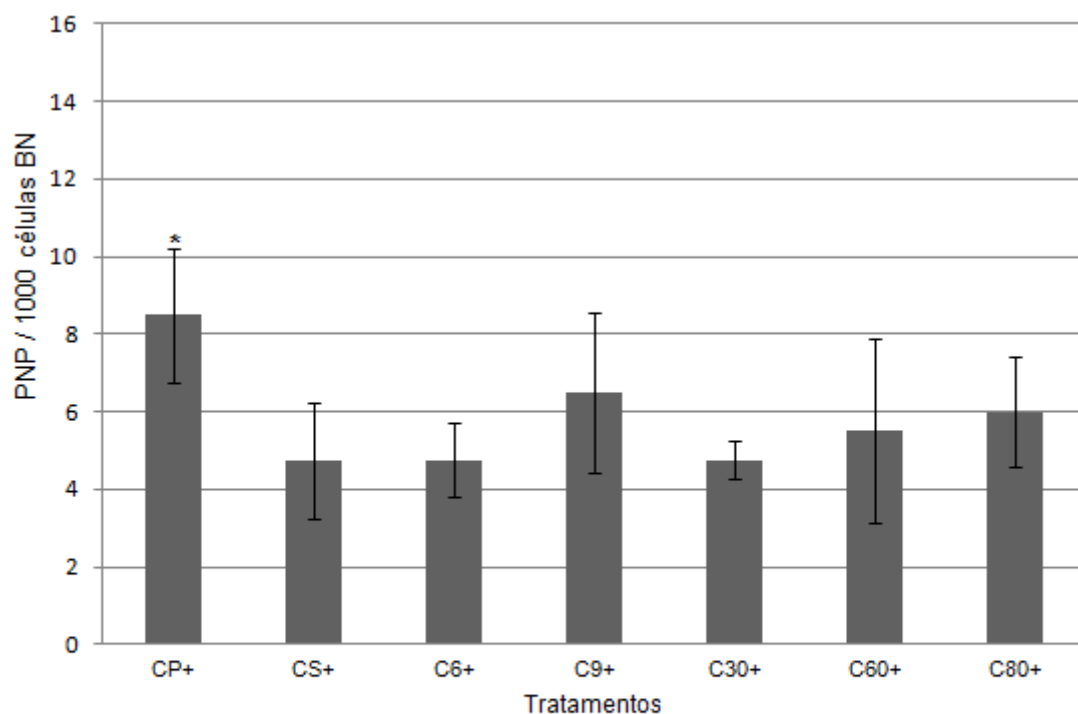


Figura 16. Pontes nucleoplasmáticas (PNP) em 1000 células binucleadas (BN) nos diferentes tratamentos com a combinação das drogas lumefantrina + artemeter após 48h de tratamento, * $p < 0,01$ (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).

4.2.4. Índice de Divisão Nuclear (IDN)

A lumefantrina causou uma diminuição significativa ($p < 0.05$) do IDN apenas na C100 em relação ao CS, o que não foi verificado em C80 e C60 (Figura 17; Tabela 1).

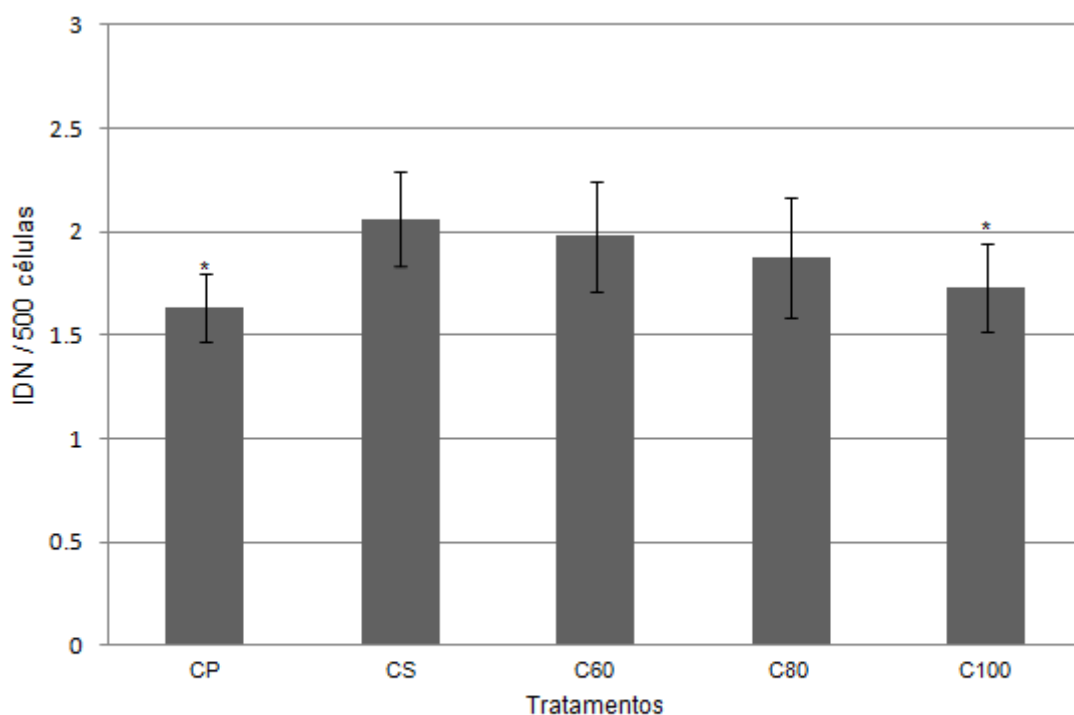


Figura 17. Índice de divisão nuclear (IDN) em 500 células nos diferentes tratamentos com a droga lumefantrina após 48h de tratamento, * $p < 0,05$ (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).

O tratado combinado houve uma diminuiu significativamente o IDN nos tratamentos C80+ e C60+ em relação ao CS+, o que não foi verificado nas concentrações C30+, C9+ e C6+ (Figura 18; Tabela 2).

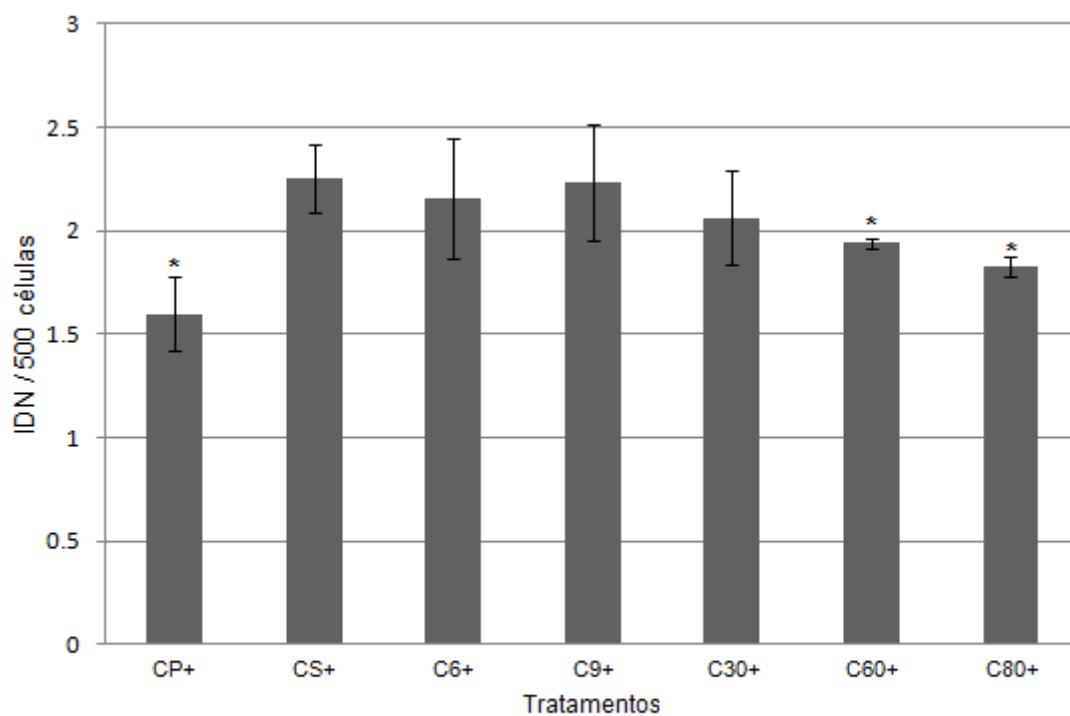


Figura 18. Índice de divisão nuclear (IDN) em 500 células nos diferentes tratamentos com a combinação das drogas lumefantrina + artemeter após 48h de tratamento, * $p < 0,05$ (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).

Tabela 1. Média $\pm$ desvio padrão dos ensaios mutagênicos e genotóxicos da droga lumefantrina.

Tratamentos	MN	BrN	PNP	IDN (%)	TM
CP	*69.25 $\pm$ 11.32	9.25 $\pm$ 4.5	*10.25 $\pm$ 4.19	**1.64 $\pm$ 0.16	*51.09 $\pm$ 3.29
CN	8.25 $\pm$ 2.22	4.5 $\pm$ 1.73	4.0 $\pm$ 2.45	2.22 $\pm$ 0.19	3.87 $\pm$ 1.10
CS	9.25 $\pm$ 1.71	4.5 $\pm$ 1.0	3.25 $\pm$ 1.26	2.06 $\pm$ 0.23	5.74 $\pm$ 0.78
C100	*70.75 $\pm$ 10.63	*26.0 $\pm$ 5.03	6.0 $\pm$ 2.16	**1.73 $\pm$ 0.21	*40.41 $\pm$ 2.59
C80	*83.25 $\pm$ 11.73	*29.0 $\pm$ 8.76	6.25 $\pm$ 1.71	1.87 $\pm$ 0.29	*28.10 $\pm$ 1.34
C60	*36.5 $\pm$ 3.70	*24.0 $\pm$ 10.23	5.25 $\pm$ 1.89	1.98 $\pm$ 0.27	14.99 $\pm$ 1.47

*p <0.01 e **p<0.05 (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando em comparação ao controle de solvente (CS)

Tabela 2. Média $\pm$ desvio padrão dos ensaios mutagênicos e genotóxicos da combinação das drogas lumefantrina + artemeter.

Tratamentos	MN	BrN	PNP	IDN (%)	TM
CP	*61.75 $\pm$ 4.65	*11.25 $\pm$ 4.11	8.50 $\pm$ 1.73	1.60 $\pm$ 0.18	*34.24 $\pm$ 3.14
CN	7.50 $\pm$ 1.91	2.50 $\pm$ 0.58	3.75 $\pm$ 0.96	2.39 $\pm$ 0.22	5.54 $\pm$ 0.97
CS	7.25 $\pm$ 0.50	4.25 $\pm$ 1.71	4.75 $\pm$ 1.50	2.26 $\pm$ 0.16	6.74 $\pm$ 0.92
C80+	*75.25 $\pm$ 8.30	*25.25 $\pm$ 5.85	6.0 $\pm$ 1.41	**1.83 $\pm$ 0.05	*30.10 $\pm$ 2.55
C60+	*31.0 $\pm$ 4.97	*22.50 $\pm$ 5.45	5.50 $\pm$ 2.38	**1.94 $\pm$ 0.03	*14.32 $\pm$ 0.85
C30+	14.0 $\pm$ 1.41	7.75 $\pm$ 0.96	4.75 $\pm$ 0.50	2.06 $\pm$ 0.23	8.26 $\pm$ 0.92
C9+	12.25 $\pm$ 3.95	6.50 $\pm$ 0.58	6.50 $\pm$ 2.08	2.23 $\pm$ 0.28	-
C6+	10.75 $\pm$ 1.50	5.0 $\pm$ 0.82	4.75 $\pm$ 0.96	2.16 $\pm$ 0.29	-

*p <0.01 e **p<0.05 (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando em comparação ao controle de solvente (CS)

4.3. Apoptose

Os dados mostraram que a taxa de apoptose aumentou nos quatro tempos testados (Tabela 3).

Tabela 3. % de apoptose em 0h, 24h, 48h e 72h de tratamento com as diferentes concentrações de lumefantrina e a combinação(+) lumefantrina + artemeter

Tratamentos	Tempo de tratamento			
	0h	24h	48h	72h
Apoptose (%)				
CP	5.87±1.17	**9.87±1.01	*16.00±1.60	*14.20±2.26
CN	4.80±0.69	6.27±0.58	8.07±1.03	8.20±0.28
CS	5.93±1.63	6.20±0.72	8.13±0.12	8.13±1.14
C100	5.33±0.50	**11.40±0.92	*14.80±1.40	*20.27±5.83
C80	6.27±1.30	**16.87±0.81	*21.60±1.97	*39.33±1.36
C80+	5.80±1.20	**16.27±0.50	*20.13±1.51	*37.13±3.31
C60	5.93±0.50	**10.13±1.50	*12.93±1.17	*17.13±1.40
C60+	5.20±1.25	**10.27±0.99	*12.93±1.53	*17.00±2.36
C30+	5.80±0.20	7.0±0.20	8.53±0.99	9.40±1.44

*p <0.01 e **p<0.05 (ANOVA / pós teste de Bonferroni) quando em comparação ao controle de solvente (CS)

A lumefantrina aumentou significativamente (p<0,05) a quantidade de células apoptóticas em todos os tratamentos após 24h, em relação ao CS, sendo que

este aumento se tornou mais significativo ($p<0,01$) após 48 e 72h de tratamento (Figura 19; Tabela 3).

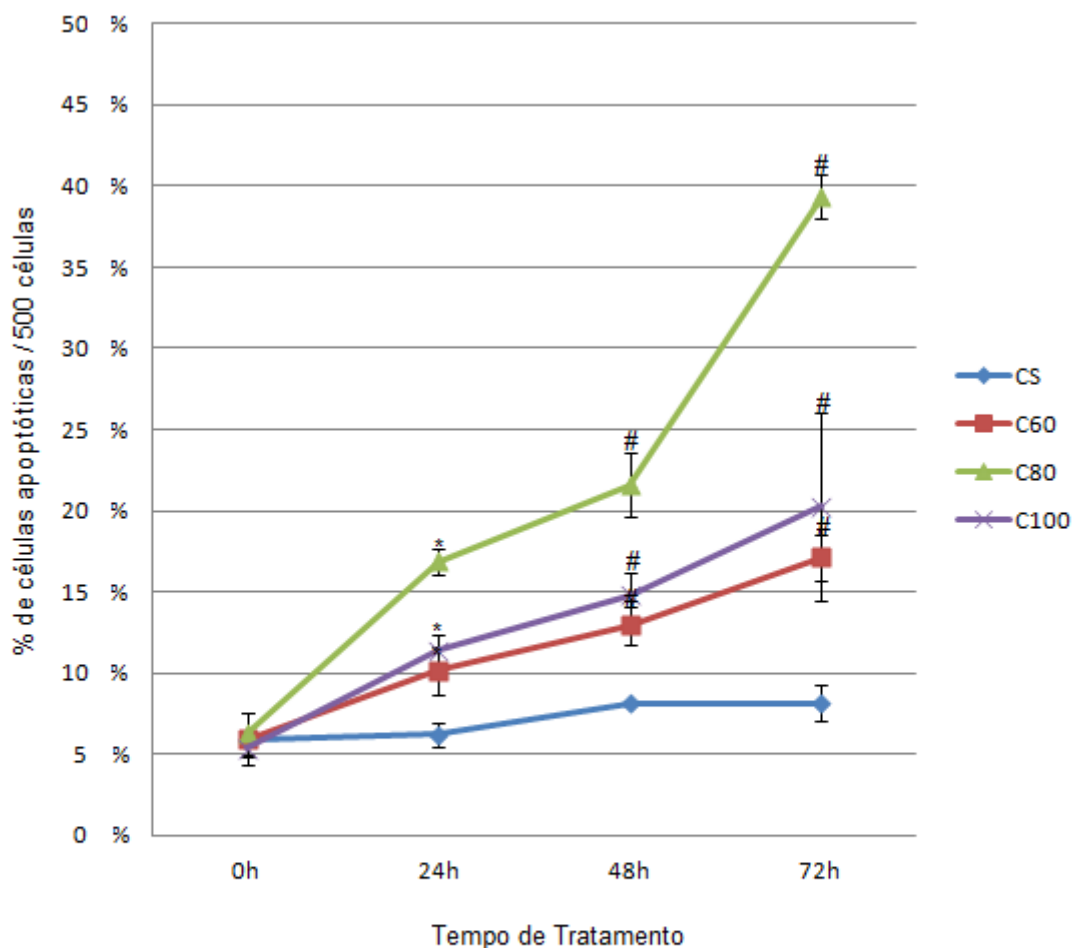


Figura 19. % de apoptose em 500 células nos diferentes tempos e tratamentos com a droga lumefantrina, * $p<0,05$ e # $p<0,01$ (ANOVA/ pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).

Os tratamentos combinados C80+ e C60+ aumentaram significativamente ($p<0.05$) o número de células apoptóticas em relação ao CS, o que não foi observado para C30+, após 24h de tratamento (Figura 14). Semelhante ao observado para o tratamento com a lumefantrina, após 48h e 72h, o aumento se tornou mais pronunciado ($p<0.01$) em C80+ e C60+ em relação à CS, o que não foi observado para o tratamento C30+ (Figura 20; Tabela 3).

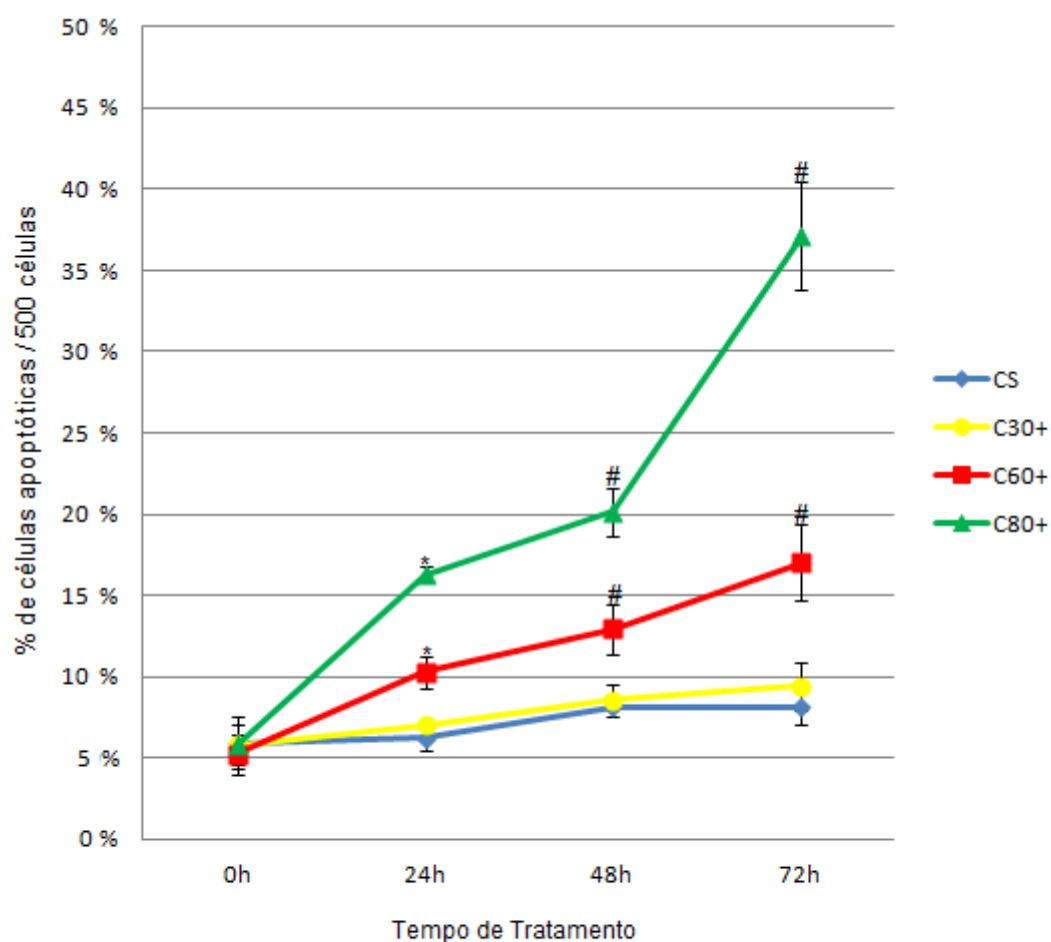


Figura 20. % de apoptose em 500 células nos diferentes tempos e tratamentos com a combinação das drogas lumefantrina + artemeter, * $p < 0,05$ e # $p < 0,01$ (ANOVA/ pós teste de Bonferroni) quando comparado ao controle de solvente (CS).

Em teste com 1 indivíduo foi verificado que nas primeiras 12h o tratamento C100 tem um maior número de células apoptóticas que C80, começando a diminuir após 24h (Figura 21).

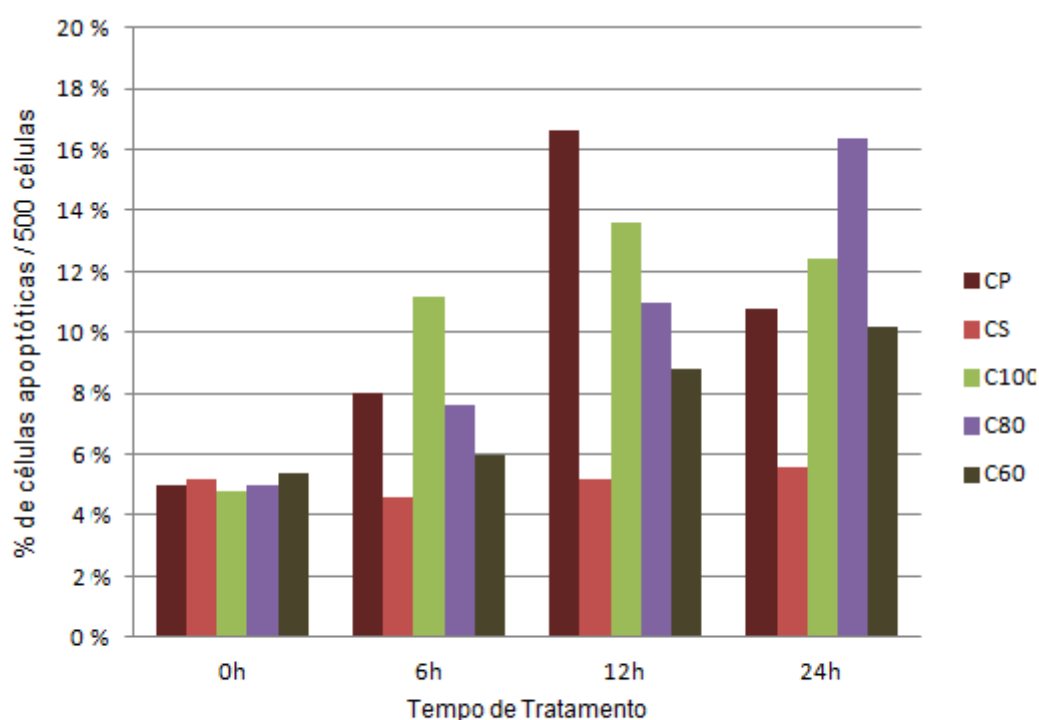


Figura 21. % de apoptose em 500 células nos diferentes tempos (0, 6, 12 e 24h) e tratamentos com a droga lumefantrina

4.4. Necrose

No teste de necrose feito a partir de 1 doador, pode-se verificar que no tratamento C100 ocorreu um grande aumento no número de células necróticas em relação aos demais tratamentos, onde também pode observar um pico de necrose no tempo de 12h (Tabela 4; Figura 22).

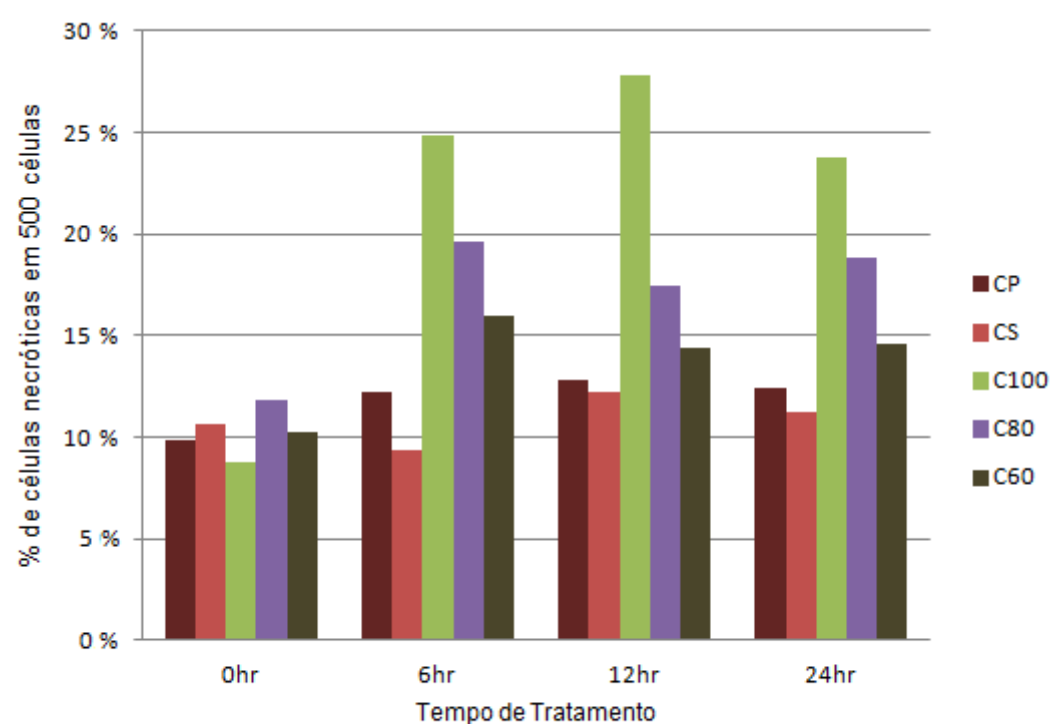


Figura 22. % de necrose em 500 células nos diferentes tempos e tratamentos com a droga lumefantrina

Tabela 4. % de necrose em 0h, 6h, 12h e 24h de tratamento com as diferentes concentrações de lumefantrina.

Tratamentos	Tempo de tratamento			
	0h	6h	12h	24h
	Necrose (%)			
CP	9,8	12,2	12,8	12,4
CN	10,4	10,0	9,4	11,8
CS	10,6	9,4	12,2	11,2
C100	8,8	24,8	27,8	23,8
C80	11,8	19,6	17,4	18,8
C60	10,2	16,0	14,4	14,6
C30	11,2	10,6	13,2	10,0

4.5. Lumefantrina versus lumefantrina + artemeter (6:1)

Como as concentrações C80 e C60 de lumefantrina foram utilizadas sozinhas e em combinação com o artemeter (C80+ e C60+), foi realizado uma comparação entre os resultados obtidos nesses tratamentos para cada um dos parâmetros avaliados, para verificar se a associação de drogas poderia potencializar ou diminuir os efeitos observados para a droga lumefantrina.

Quando comparados pelo teste t, os tratamentos C80 e C80+, bem como C60 e C60 +, não houve diferença significativa nos teste mutagênicos, genotóxicos (Figura 23) e de apoptose (Figura 24).

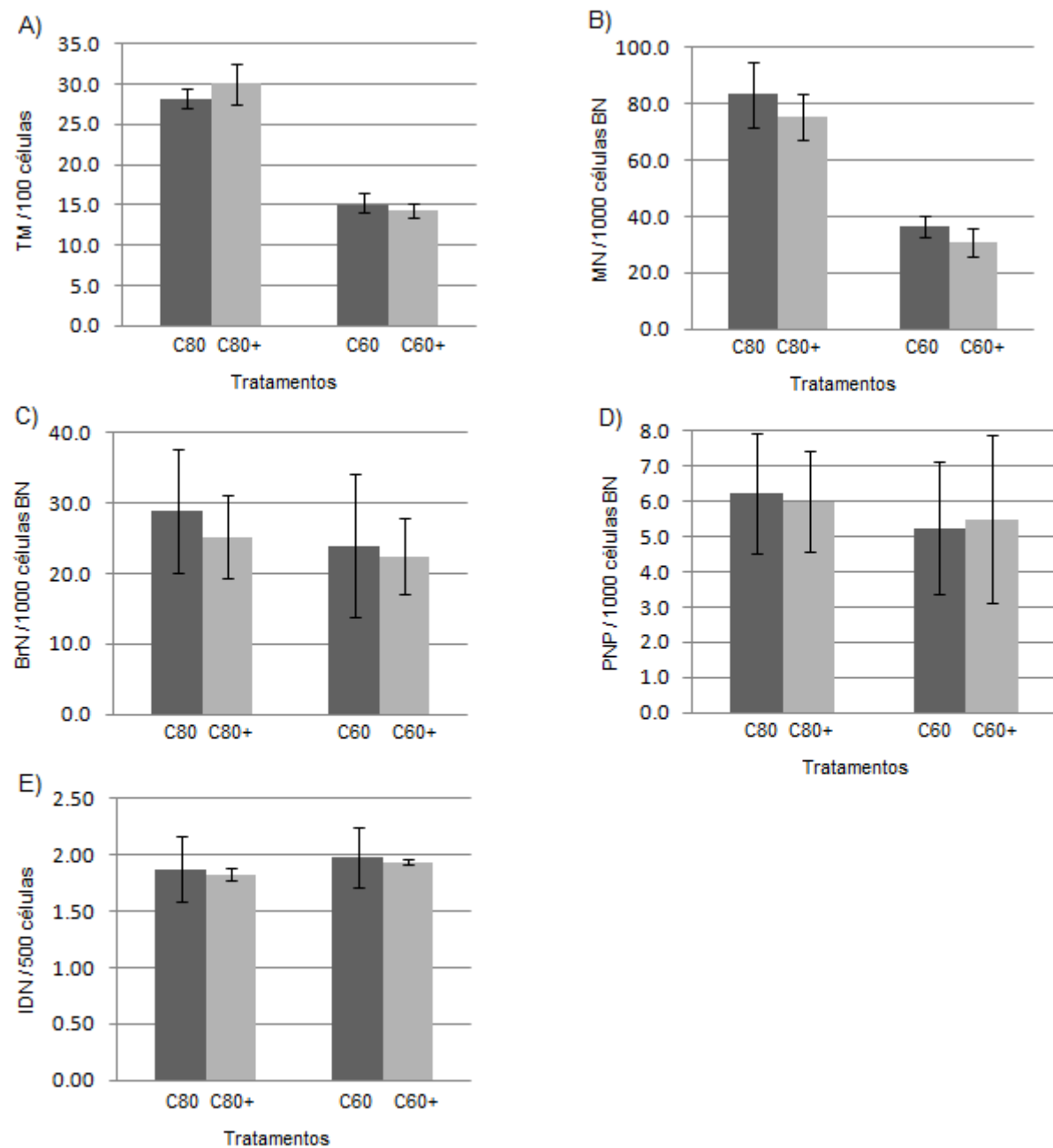


Figura 23. Comparações das médias $\pm$ desvios padrão entre os tratamentos com a droga Lumefantrina pura (C80 e C60) e combinada com o Artemeter (C80+; C60+) onde em A) o "tail moment" (TM), em B) a quantidade de micronúcleos (MN), em C) os brotos nucleares (BrN), já em D) e E), as pontes nucleoplasmáticas (PNP) e o índice de divisão nuclear (IDN) respectivamente.

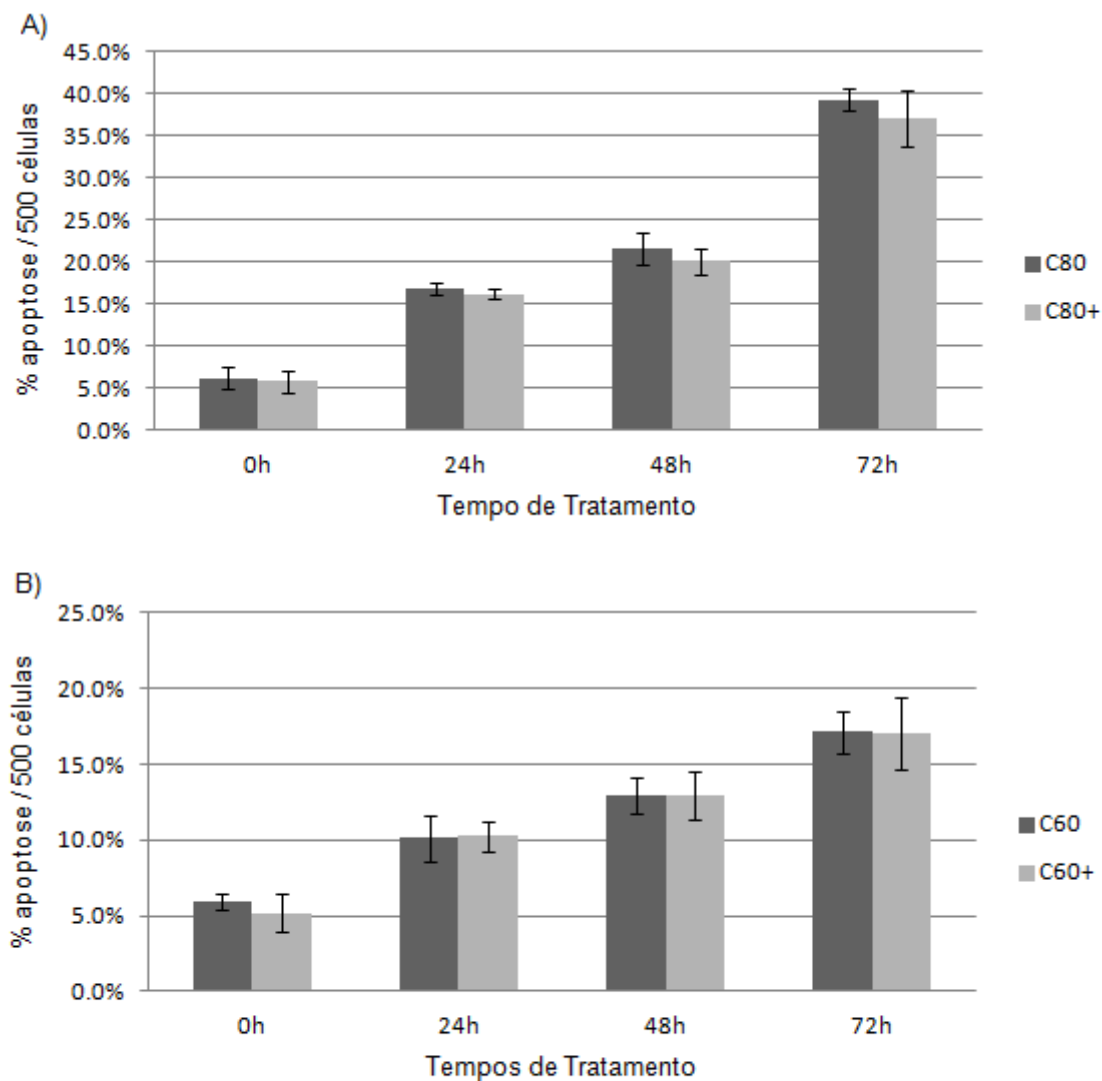


Figura 24. Comparação das médias $\pm$ desvio padrão de células apoptóticas (%) entre os tratamentos com a droga lumefantrina pura (C80 e C60) e combinada com o artemeter (C80+ e C60+), onde em A) os tratamentos C80 e C80+ e em B) os tratamentos C60 e C60+.

5. Discussão

Como visto anteriormente, o tratamento com a combinação lumefantrina + artemeter em dose única tem sido utilizado atualmente em vários locais do mundo onde a droga cloroquina tem se mostrado ineficiente contra cepas de *P. falciparum* resistente a essa droga.

Este tratamento combinado é bem aceito, pois seus efeitos colaterais são poucos; além do mais, possui uma maior eficiência no alívio dos sintomas. Tanto a via do tratamento (oral), facilitando a administração da droga, quanto o curto tempo de tratamento (3 dias) permite que este não seja abandonado e evita recidivas, ou até mesmo que o parasito possa adquirir alguma resistência.

No entanto, poucos são os estudos em relação aos efeitos a nível celular e molecular destas drogas quando utilizada em sub ou sobre doses.

Neste estudo, verificou-se que tanto a droga lumefantrina pura quanto em combinação com o artemeter apresentam efeitos mutagênicos, genotóxicos, citostáticos e apoptóticos em linfócitos humanos.

Em relação ao ensaio genotóxico, observou-se que a droga lumefantrina e a combinação com o artemeter podem causar danos genotóxicos nas concentrações aqui testadas, sendo este efeito concentração-dependente.

Uma explicação para o efeito genotóxico da lumefantrina e da combinação seria que esses tratamentos podem ter aumentado o estresse oxidativo nas células, e assim produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) que favorecem os danos no DNA.

Em um estudo de Adaramoye et al (2008), os autores demonstraram uma diminuição nos níveis da defesa antioxidante ,tanto o sistema não enzimático quanto

o enzimático, em ratos aos quais foram administrados o artemeter, a combinação artemeter + lumefantrina e a halofantrina.

Estas enzimas são a primeira linha de defesa contra o ROS, a sua alteração pode significar que as mesmas foram consumidas ou modificadas no combate ao estresse oxidativo (Hochstein e Atallah, 1988).

Também foi demonstrado por Nduka e Tolulope(2011), que administraram a combinação de artemeter + lumefantrina em ratos e verificaram que a mesma pode modular a atividade de enzimas biomarcadoras de estresse oxidativo.

Vale ressaltar que aumentando o estresse oxidativo, a célula acaba por perder sua homeostase e assim favorece o aumento de danos no DNA, os quais podem agir em vários mecanismos relacionados ao envelhecimento e o câncer (Sedelnikova et al, 2010; Kryston et al, 2011).

Sabe-se que a formação de micronúcleos deve-se a danos clastogênicos e/ou aneugênicos que são irreparáveis no DNA, estes efeitos podem ser produzidos durante o ciclo celular pelo sistema de reparo da célula. Estes danos podem se dar de varias maneiras; como erro na maquinaria de reparo do DNA, erro na replicação, defeitos no mecanismo das fibras do fuso e quebra de fita dupla(Fenech et al,2011).

Pode-se verificar que o efeito da droga foi concentração-dependente, visto que nas menores concentrações testadas da combinação que foram de 30, 9 e 6 µg/ml de lumefantrina + 5, 1,5 e 1 µg/ml de artemeter respectivamente, não foram encontrados danos significativos, demonstrando que as concentrações próximas da encontrada no plasma são seguras às células.

A quantidade de droga testada em nossos ensaios está acima daqueles encontrados no plasma, em alguns trabalhos a faixa avaliada de lumefantrina no plasma encontra-se entre 6 a 30000 ng/ml (Mansor et al, 1996; Ezzet et al, 2000;

Ashley et al, 2007; Hatz et al, 2008). Quanto ao artemeter, a concentração plasmática pode variar entre 10 a 1000 ng/ml (Navaratnan et al, 1995 ; Shi et al, 2006).

Estas concentrações são muito difíceis de serem avaliadas, pois a lumefantrina tem uma absorção muito variável, dependente da alimentação do indivíduo, do estagio da doença e de que alimento é usado para ingerir junto com a droga sendo que os alimentos mais gordurosos proporcionam maior biodisponibilidade da droga (Ashley et al, 2007).

Em tratamentos prolongados e com concentrações de lumefantrina + artemeter acima do indicado é possível que haja um maior aumento do estresse oxidativo (Olufemi et al, 2009).

Muitos estudos revelam que a elevação do estresse oxidativo causado pelo aumento das ROS, por causar danos no DNA, também causam um crescimento no número de micronúcleos e brotos celulares nas células (Bonassi et al, 2007). Parâmetros que também foram aumentados no presente estudo.

Embora os dados mostrem uma relação concentração-dependente para a droga, verificou-se que o número de MN na concentração C100 foi menor que em C80. Isto pode ter ocorrido devido ao dano maior causado por essa concentração da droga lumefantrina, que possuiria efeito citostático e citotóxico mais prejudicial para as células. Desta forma, ou por não permitir a formação dos MNs, ou por eliminar os MNs formados juntamente com a célula, haveria uma diminuição do número de MN observados em relação a C80.

Essa hipótese é favorecida pela observação que houve uma diminuição do IDN, mostrando que, de fato, nesta concentração há o bloqueio da divisão celular.

A diminuição do IDN também foi verificada nos tratamentos C80+ e C60+. Como este efeito não foi observado quando a lumefantrina pura foi usada nos tratamentos C80 e C60, é possível que o efeito citostático, neste caso, seja devido ao efeito do sinérgico da lumefantrina + artemeter.

O efeito dos derivados de artemisina em células cancerígenas já é bem conhecido, inclusive do artemeter (Efferth et al, 2002; Efferth e Oesch, 2004; Ortiz e Wei, 2012). Sabe-se que o artemeter por si tem uma ação citotóxica em altas concentrações, sendo sugerida sua utilização no tratamento de células cancerígenas (Singh e Panwar, 2006; Duffy e Wade, 2012).

Efferth (2005) também sugere que a artemisina e seus derivados podem ter como alvo proteínas que participam da proliferação celular, possuindo assim, efeitos anti-proliferativos.

Quanto a frequência de PNPs, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos. Uma hipótese é que as PNPs são formadas a partir de cromossomos dicêntricos que, ao final da anáfase, são puxados para cada lado. Após a telófase os núcleos vão se separar e as PNPs serão “arrebentadas” e seus resquícios possivelmente se tornariam MNs, por este motivo dificilmente veríamos as PNPs (Fenech et al, 2011).

Diferente dos danos mutagênicos causados nos linfócitos, os efeitos genotóxicos em C100 foram maiores que em C80, assim podemos atribuir este efeito ao pequeno intervalo de tempo em que foram analisados e que permitiram visualizar a grande quantidade de danos causados no DNA pelo tratamento C100. Tais prejuízos possivelmente causariam rapidamente a morte das células, corroborando com os resultados obtidos pelo parâmetro do IDN, onde vimos uma diminuição significativa no crescimento celular.

Quando analisado o efeito apoptótico, verificou-se que tanto a lumefantrina quanto a combinação com o artemeter aumentam a frequência de apoptose em 24h e esse aumento se torna mais substancial em 48h e 72h, em todos os tratamentos com exceção da concentração menor testada que foi a combinada de C30+.

Esse efeito concentração-dependente pode ser visto em vários trabalhos onde se utilizou drogas antimaláricas, e de fato verificou-se que com o passar do tempo, este índice de apoptose aumenta como visto no trabalho de Alcantara et al (2011) com o artemeter e Mota et al (2011) com artesunato.

Podemos sugerir que por ser uma droga de meia vida longa, a lumefantrina pode se acumular e propiciar a morte celular, pelo aumento do estresse oxidativo causando mais danos ao DNA, e quanto mais tempo à droga permanece em contato com as células, maior esse estresse, maiores os danos e consequentemente maior o índice de apoptose.

Percebemos que o índice de apoptose do tratamento C100 em todos os tempos são menores que os de C80, esse fato pode ser devido a alta citotoxicidade da droga nesta concentração mais alta, levando as células rapidamente a morte nas primeiras 24h.

Esta hipótese foi verificada por um teste de apoptose e necrose, onde verificou-se que, de fato, nas primeiras 12h de tratamento, ocorre um maior número de mortes por apoptose e por necrose no tratamento C100 (13,6%; 27,8%) em relação a C80 (11%; 17,4%), demonstrando que de fato C100 está sendo mais tóxico nas primeiras 12h.

Em todos os testes, quando comparados às concentrações de C80 com C80+, e C60 com C60 +, não foram observadas nenhuma diferença estatística.

Esses resultados sugerem que pode-se atribuir os danos mutagênicos, genotóxicos e apoptóticos a lumefantrina mais que do artemeter.

Em trabalho de Alcantara et al (2011), o mesmo verificou danos mutagênicos , genotóxicos e apoptóticos causado pelo artemeter. No entanto, os danos encontrados foram em concentrações de artemeter pelo menos 10 vezes maiores do que as testadas no presente trabalho, sendo que em concentrações menores, não foram observados efeitos significativos.

Como vimos anteriormente os tratamentos C80 e C80+, C60 e C60+, não demonstraram diferenças significativas entre si. No entanto, foi possível observar uma diminuição significativa no IDN, quando comparados C80+ e C60+ em relação ao CN+ e CS+, o que não foi observado com C80 e C60. Este dado pode indicar que possivelmente as concentrações da combinação lumefantrina associadas ao artemeter podem potencializar o efeito citostático, efeito este, importante no tratamento de células cancerosas.

Os resultados obtidos são importantes para fortalecer a pesquisa em relação aos efeitos destas drogas diretamente no DNA, pois ainda são escassos ou pouco trabalhados. Sendo essa combinação uma arma eficiente contra uma das doenças que mais mata no mundo, seu conhecimento em todos os aspectos é importante, para evitar efeitos colaterais indesejados e possíveis doenças de caráter genético.

Este trabalho vem contribuir para pesquisas futuras que possam aprofundar-se nas vias de apoptose causados por estas drogas , assim como fortalecer as pesquisas moleculares em células humanas, visto que grande parte dos estudos realizados são em animais modelo.

6. Conclusão

Com estes resultados pode se concluir que a lumefantrina tanto pura quanto em combinação com o artemeter (6:1) possui efeitos mutagênicos, genotóxicos e apoptóticos nas concentrações aqui testadas, onde causou um aumento no número de micronúcleos e brotos nucleares demonstrando uma relação concentração-dependente, o que não aconteceu em relação ao parâmetro pontes nucleoplasmáticas.

Houve também um aumento nos danos genotóxicos, concentrações-dependentes, observado pelo parâmetro “*tail moment*” tanto quando usado a lumefantrina quanto em combinação com o artemeter.

Os resultados também demonstraram um aumento da apoptose nos tratamentos em todos os tempos testados quando usada a lumefantrina pura e em combinação com o artemeter.

Em nenhum dos teste foram verificadas diferenças no aumento dos danos mutagênicos, genotoxícos e apoptóticos quando comparados os resultados da droga lumefantrina pura e em combinação, demonstrando assim que o artemeter não potencializa os danos causados pela lumefantrina quando combinados.

7. Referencias bibliográficas

Abdon, N.P; Yecê, A; Uchôa, S; Souza, M.D. Assessment of the response to reduced treatment schemes for vivax malaria. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34, p. 343-348, 2001

Adaramoye, O.A; Osaimoje, D.O; Akinsanya, A.D; Nneji, C.M; Fafunso, M.A; Ademowo, O.G. Changes in antioxidant status and biochemical indices after acute administration of artemether, artemether-lumefantrine and halofantrine in rats. *Basic and clinical pharmacology and toxicology*, 102, p. 412-418, 2008

Afonso, A; Hunt, P; Cheesman, S; Alves, A.C; Cunha, C.V; Rosário, V; Cravo, P. Malaria Parasites Can Develop Stable Resistance to Artemisinin but Lack Mutations in Candidate Genes *atp6* (Encoding the Sarcoplasmic and Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase), *tctp*, *mdr1*, and *cg10*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p. 480-489, 2006

Akerele, J.O; Ebor, E; Ebor, O;. Studies on the Genotoxic and Mutagenic Potentials of Mefloquine. *Environmental Medicine*, v. 1, p. 91-98, 2002

Alcântara, D.D.F.A; Ribeiro, H.F; Cardoso, P.C.S; Araújo, T.M.T; Burbano, R.R; Guimarães, A.C; Khayat, A.S; Bahia, M.O. In vitro evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of artemether , an antimalarial drug , in a gastric cancer cell line (PG100). *Journal of Applied Toxicology*, Artigo ID 21953315, 2011

Alecrim, M.G.C. Clinical aspects, resistance and parasitary polymorphism of *Plasmodium vivax* malaria in Manaus. Tese de doutorado, universidade de Brasília (UNB), 2000

Alexandre, M. A; Ferreira, C. O; Siqueira, A. M; Magalhães, B.L; Mourão, M.P.G.M; Lacerda, M.V; Alecrim, M.G.C. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerging infectious diseases*, v. 16, p. 1611-1614, 2010

Ambachew, M.Y; Awash, T; Yngve, B; Pascal, R. Confirmed vivax resistance to chloroquine and effectiveness of artemether-lumefantrine for the treatment of vivax malaria in Ethiopia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 84, p. 137-140, 2011

Andrade, B.B; Reis-Filho, A; Souza-Neto, S.M; Clarêncio, J; Camargo, L.M.A; Barral, A; Barral-Neto, M. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malaria Journal*, 9:13 , 2010

Annerberg, A; Singtoroj, T; Tipmanee, P; White, N.J; Day, N.P.J; Lindegårdh, N. High throughput assay for the determination of lumefantrine in plasma. *Journal of chromatography B*, v. 822, p. 330-333, 2005

Ashley, E.A; Stepniewska, K; Lindegardh, N; Annerberg, A; Kham, A; Brockman, A; Singhasivanon, P; White, N.J; Nosten, F. How much fat is necessary to optimize

lumefantrine oral bioavailability?. Tropical medicine and international health, v. 12, p. 195-200, 2007

Ashley, E.A; Stepniewska, K; Lindegårdh, N; Annerberg, A; Kham, A.M; Brockman, A.L; Singhasivanon, P; White, N.J; Nosten, F. How much fat is necessary to optimize lumefantrine oral bioavailability?. Tropical Medicine and International Health, v. 12, p. 195-200, 2007

Ayres, M; Ayres, M.J.R; Ayres D.L; Dos Santos, A.S. Biostat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá: Brasília. 2007

Bannister , L.H; Hopkins, J.M; Fowler, R.E; Krishna, S; Mitchell, G.H. A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages. Parasitology Today, v. 16, p. 427-433, 2000

Benhamou, S; Sarasin, A. Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. Mutation research, v. 462, p. 149-158, 2000

Bonassi, S; Znaor, A; Ceppi, M; Lando, C; Chang, W.P; Holland, N; Kirsch-Volders, M; Zeiger, E; Ban, S; Barale, R; Bigatti, M.P; Bolognesi, C; Cebulska-Wasilewska, A; Fabianova, E; Fucic, A; Hagmar, L; Joksic, G; Martelli, A; Migliore, L; Mirkova, E; Scarfi, M.R; Zijno, A; Norppa, H; Fenech, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. Carcinogenesis, v. 28, p. 625-631, 2007.

Breman, J. G. The ears of the hippopotamus : Manifestations , determinants , and estimates of the malaria burden. Tropical Medicine, v. 64, p. 1-11, 2001

Breman, J.G; Alilio, M.S; Mills, A. Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary. The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 71, p. 1-15, 2004

Budihardjo, I; Oliver, H; Lutter, M; Luo, X; Wang, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annual Review of Cell and Developmental Biology, v. 15, p.269-290, 1999

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Malaria: Topic home. Disponível em:< <http://www.cdc.gov/malaria/> > Acesso em 15/02/2012

Chan, K.L; North, P.S; Hickson, I.D. BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. The EMBO Journal, v. 26, p. 3397–3409, 2007

Chang, H.Y; Yang, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of Caspases. Microbiology Molecular Biology Review, v. 64, p. 821-846, 2000

Chen, H.H; Zhou, H.J; Fang, X. Inhibition of human cancer cell line growth and human umbilical vein endothelial cell angiogenesis by artemisinin derivatives in vitro. *Pharmacological Research*, v. 48, p. 231-236, 2003

Chen, P.Q; Li, G.Q; Guo, X.B; He, K.R; Fu, Y.X; Fu, L.C; Song, Y.Z. The infectivity of gametocytes of *Plasmodium falciparum* from patients treated with artemisinin. *Chinese Medicine Journal*, v. 74, p. 709-711, 1994

Chotivanich, K; Udomsangpetch, R; Pattanapanyasat, K; Chierakul, W; Simpson, J; Looareesuwan, S; White, N. Hemoglobin E: a balanced polymorphism protective against high parasitemias and thus severe *P. falciparum* malaria. *Blood journal*, v.100, p.1172-1176, 2002

Cojean, S; Hubert, V; Le Bras, J; Durand, R. Resistance to dihydroartemisinin. *Emerging Infectious Diseases*, v. 12, p. 1798-1799, 2006

Colussi, D; Parisot, C; Legay, F; Lefevre, G. Binding of artemether and lumefantrine to plasma proteins and erythrocytes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 9, p. 9–16, 1999

Cowman, A.F; Galatis, D; Thompson, J.K. Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the *pfmdr1* gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*, v. 91, p. 1143-1147, 1994

Cox-Singh, J.; Singh ,B. Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance?. *Trends in parasitology*, v. 24, p. 406-410 , 2008

Cui, L; Escalante, A.A; Imwong, M; Snounou, G. The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations. *Trends in Parasitology*, v. 19, p. 220-226, 2003

Cunico, W; Carvalho, S.A; Claudia, R.B; Marques G.H; Marques, G.H. Fármacos antimalariais – história e perspectivas. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 89, p. 49-55, 2008

Djimdé, A; Lefèvre, G. Understanding the pharmacokinetics of Coartem. *Malaria journal*, v. 8, Suppl 1:S4, 2009

Duffy, R; Wade, C; Chang, R. Discovery of anticancer drugs from antimalarial natural products: a MEDLINE literature review. *Drug discovery today*, v. 0, p. 1-12, 2012

Efferth, T. Mechanistic perspectives for 1,2,4-trioxanes in anti-cancer therapy. *Drug resistance updates*, v. 8, p. 85-97, 2005

Efferth, T; Oeschb, F. Oxidative stress response of tumor cells: microarray-based comparison between artemisinins and anthracyclines. *Biochemical Pharmacology*, v. 68, p. 3–10, 2004

Efferth, T; Olbrich, A; Bauer, R. mRNA expression profiles for the response of human tumor cell lines to the antimalarial drugs artesunate, arteether, and artemether. *Biochemical pharmacology*, v. 64, p. 617-623, 2002

El-Habit, O.H; Al-Khamash, H.S. Testing the cytotoxicity and genotoxicity of the antimalarial drug mefloquine. *Journal of King Saud University* ,(No Prelo), 2011

Ezzet, F; Mull, R; Karbwang, J. Population pharmacokinetics and therapeutic response of CGP 56697(artemether+benflumetol) in malaria patients. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 46, 553-561, 1998

Ezzet, F; van Vugt, M; Nosten, F; Looareesuwan, S; White, N.J. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Lumefantrine (Benflumetol) in Acute Falciparum Malaria. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Lumefantrine (Benflumetol) in Acute Falciparum Malaria. Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, v. 44, p. 697-704, 2000

Falade, C; Manyando, C. Safety profile of Coartem: the evidence base. *Malaria journal*, v. 8, Suppl 1:S6, 2009

Falade, C; Makanga, M; Premji, Z; Ortmann, C.E; Stockmeyer, M; de Palacios, P.I. Efficacy and safety of artemether-lumefantrine (Coartem) tablets (six-dose regimen) in African infants and children with acute, uncomplicated falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 99, p. 459-67, 2005

Fenech, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research*, v. 600, p.58–66, 2006

Fenech, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, v. 455, p. 81-95, 2000

Fenech, M; Chang, W.P; Kirsch-Volders, M; Holland, N; Bonassi, S; Zeiger, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation research*, v. 534, p. 65-75, 2003

Fenech, M; Chang, W.P; Kirsch-Volders, M; Holland, N; Bonassie, S; Zeigerf, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, v. 534, p. 65-76, 2003

Fenech, M; Kirsch-Volders, M; Natarajan, A.T; Surralles, J; Crott, J.W; Parry, J; Norppa, H; Eastmond, D.A; Tucker, J.D; Thomas, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, v. 26, p. 125–132, 2011

Foley, M; Tilley, L. Quinoline Antimalarials : Mechanisms of Action and Resistance and Prospects for New Agents. *Pharmacology Therapy*, v. 79, p. 55-87, 1998

Friedberg, E. C. DNA damage and repair. *Nature*, v. 421, p. 436-440, 2003

Friedberg, E. C. Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 6, p. 943-953, 2005

Gaubatz, J.W. DNA base modifications in aging. *Advances in Cell Aging and Gerontology*, v. 4, p. 41-72, 2001

Genovese, R.F; Newman, D.B. Understanding artemisinin-induced brainstem neurotoxicity. *Archives of Toxicology*, v. 82, p. 379-385, 2008

Goldberg, D.E; Slater, A.F.G. The pathway of hemoglobin degradation in malaria parasites. *Parasitology Today*, 8 (8), p.280-283 , 1992

Golenser, J; Waknine, J. H; Krugliak, M; Hunt, N. H; Grau, G. E. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. *International Journal for Parasitology*, v. 36, p. 1427-1441, 2006

Goodman, L.S; Gilmar, A. G. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11^o ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2007

Gottlieb, E; Vander Heiden, M.G; Thompson, C.B. Bcl-XL prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, v.20, p. 5680-5689, 2000

Grivicich, I; Regner, A; Brondani, A.R; Apoptosis: Programmed Cell Death. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53, p. 335-343, 2007

Hanawalt, P; Ford, J.M; Lloyd, D.R. Functional characterization of global genomic DNA repair and its implications for cancer. *Mutation Research*, v. 544, p. 107-114, 2003

Haq, M.Z.U; Mishra, B.R; Goyal, N; Sinha, V.K. α/β -Arteether-induced mania in a predisposed adolescent. *General Hospital Psychiatry*, v. 31, 391–393, 2009

Hartwell, L. H; Weinert, T. A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, v. 246, p. 629-34, 1989

Hatz, C; Soto, J; Nothdurft, H.D; Zoller, T; Weitzel, T; Loutan, L; Bricaire, F; Gay, Fredereick; Burchard, G; Andriano, K; Lefevre, G; de Palacios, P.I . Treatment of Acute Uncomplicated Falciparum Malaria with Artemether-Lumefantrine in Non-

immune Populations : A Safety , Efficacy , and Pharmacokinetic Study. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene , v. 78, p. 241-247, 2008

Haynes, R.K; Krishna, S. Artemisinins: activities and actions. Microbes and Infection, v. 6, p. 1339–1346, 2004

Heddini, A. Malaria pathogenesis: a jigsaw with an increasing number of pieces. International Journal for Parasitology, v. 32, p.1587 – 1598, 2002

Heddle, J.A; Fenech, M; Hayashi, M; MacGregor, J.T. Reflections on the development of micronucleus assays. Mutagenesis, v. 26, p.3-10, 2011

Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. Nature, v. 407, p. 770-776, 2000

Hochstein, P; Atallah, A S. The nature of oxidants and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. Mutation research, v. 202, p. 363-375, 1988

Howard, P.P.A; Wood, D. The safety of antimalarial drugs in pregnancy. Drug safety, v. 14, p. 131-145, 1996

Imwong, M; Sudimack, D; Pukrittayakamee, S; Osorio, L; Carlton, J.M; Day, N.P; White, N.J; Anderson, T.J .Microsatellite variation, repeat array length, and population history of *Plasmodium vivax*. Molecular Biology and Evolution, v. 23, p. 1016–1018, 2006

Joishy, S.K; Hassan, K; Lopes, M; Lie-Injo, L.E. Clinical, genetic and fertility studies of Indian with s-globin gene and the influence of Hb S on Plasmodium falciparum malaria infection. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 82, p.515-519, 1988

Kannan, R; Kumar, K; Sahal, D; Kukreti, S; Chauhan, V.S. Reaction of artemisinin with haemoglobin: implications for antimalarial activity. Biochemical Journal, v. 385, p. 409–418, 2005

Karwatka, D.P. Modifications of nucleosides by endogenous mutagens–DNA adducts arising from cellular processes. Bioorganic Chemistry, v. 36, p. 198- 213, 2008

Kerb, R; Fux, R; Morike, K; Kremsner, P.G; Gil, J.P; Gleiter, C.H; Schwab, M. Pharmacogenetics of antimalarial drugs: effect on metabolism and transport. The Lancet, v. 9, p. 760-774, 2009

Kochar, D.K; Saxena, V.; Singh, N.; Kochar, S.K.; Kumar, S.V; Das, A. Plasmodium vivax malaria. Emerging Infectious Diseases, v.11, p. 132—134, 2005

Kokwaro, G; Mwai, L; Nzila, A. Artemether/lumefantrine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria. Expert Opinion on Pharmacotherapy, v. 8, p. 75-94, 2007

Kremsner, P.G; Krishna, S. Antimalarial combinations. The Lancet , v. 364, p. 285-294, 2004

Krishna, G; Urda, G; Theiss, J. Principles and practices of integrating genotoxicity evaluation into routine toxicology studies: a pharmaceutical industry perspective. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 32, p. 115-120, 1998

Krishna, S; Woodrow, C. J; Staines, H. M; Haynes, R. K; Mercereau-Puijalon, O. Re-evaluation of how artemisinins work in light of emerging evidence of in vitro resistance. *Trends in Molecular Medicine*, v. 12, p. 200-205, 2006

Krungkrai, S.R; Yuthavong, Y. The antimalarial action on *Plasmodium falciparum* of qinghaosu and artesunate in combination with agents which modulate oxidant stress. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, p.710–714, 1987

Kryston, T. B; Georgiev, A. B; Pissis, P; Georgakilas, A. G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation research*, v. 711, p. 193-201, 2011

Lacerda, M.V.G; Mourão, M.P.G; Alexandre, M.A.A; Siqueira, A.M; Magalhães, B.M.L; Martinez-Espinosa, F.E; Santana Filho, F.S; Brasil, P; Ventura, A.M.R.S; Tada, M.S; Couto, V.S.C.D; Silva, A.R; Silva, R.S.U; Alecrim, M.G.C. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malaria journal*, 11:12 , 2012

Lacerda, M.V.G; Zackiewicz, C; Alecrim, W.D; Alecrim, M.G.C. The neglected *Plasmodium vivax*: are researchers from endemic areas really concerned about new treatment options?. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, p.489-490, 2007

Lai, H; Sasaki, T; Singh, N.P; Messay, A. Effects of artemisinin-tagged holotransferrin on cancer cells. *Life Sciences*, v. 76, p. 1267-1279, 2005

Lawn, S.D; Krishna, S; Jarvis, J.N; Joet, T; Macallan, D.C. Case reports: pernicious complications of benign tertian malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.97, p. 551—553, 2003

Leeb, A; Wernsdorfer, G; Satimai, W; Wiedermann, U; Congpuong, K; Wernsdorfer, W.H. Pharmacodynamic interaction between lumefantrine and desbutyl-benflumetol in *Plasmodium falciparum* in vitro. *Wiener klinische Wochenschrift*, v. 122, p. 61-65, 2010

Li, Q.G; Peggins, J.O; Fleckenstein, L.L; Masonic, K; Heiffer, M.H; Brewer, T.G. The Pharmacokinetics and Bioavailability of Dihydroartemisinin, Arteether, Artemether, Artesunic Acid and Artelinic Acid in Rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 50, p. 173–182, 1998

Li, Q; Hickman, M. Toxicokinetic and toxicodynamic (TK/TD) evaluation to determine and predict the neurotoxicity of artemisinins. *Toxicology*, v. 279, p. 1-9, 2011

Li, W; Mo, W; Shen, D; Sun, L; Wang, J; Lu, S; Gitschier, J.M; Zhou, B. Yeast Model Uncovers Dual Roles of Mitochondria in the Action of Artemisinin. *Plos Genetics*, v. 1, p. 329-334, 2005

Lin, A.J; Li, L.Q; Klayman, D.L; George, C.F; Flippen-Anderson, J.L. Antimalarial activity of new water-soluble dihydroartemisinin derivatives. 3. Aromatic amine analogues. *Journal of medicinal chemistry*, v. 33, p. 2610-2614, 1990

Loiola, C.C; da Silva, C.J; Tauil, P.L. Malaria control in Brazil: 1965 to 2001. *Revista Panamericana de Salud Publica*, v. 11, p.235-244. 2002

Luxemburger, C; Ricci, F; Nosten, F; Raimond, D; Bather, S; White, N.J. The epidemiology of severe malaria in an area of low transmission in Thailand. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 91, p. 256-262, 1997

Mansor, S.M; Navaratnam, V; Yahaya, N; Nair, N.K; Wernsdorfer, W.H; Degen, P.H. Determination of a new antimalarial drug, benflumetol, in blood plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography B: Biomedical applications*, Amsterdam, v. 682, p. 321-325, 1996

Marrelli M.T; Branquinho M.S; Hoffmann E.H.E; Taïpe-Lagos C.B; Natal D; Kloetzel J.K. Correlation between positive serology for *Plasmodium vivax*-like/*Plasmodium simiovale* malaria parasites in the human and anopheline populations in the State of Acre, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 92, p. 149-151, 1998

Marsh, K; Otoo, L; Hayes, R.J; Carson, D.C; Greenwood, B.M. Antibodies to blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* in rural Gambians and their relation to protection against infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 83, p. 293–303, 1989

Menard, D; Djalle, D; Manirakiza, A; Yapou, F; Siadoua, V; Sana, S; Matsika-Claquin, D.M; Nestor, M; Talarmin, A. Drug-resistant malaria in Bangui, Central African Republic: an in vitro assessment. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 73, 239–243, 2005

Mendis, K.; Sina, B. J.; Marchesini, P.; Carter, R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 64, p. 97-106, 2001.

Meshnick, S.R. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. - *International journal for parasitology*, v. 32, p.1655–1660, 2002

Meshnick, S.R; Taylor, T.E; Kamchonwongpaisan, S. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiological reviews*, v. 60, p. 301-315, 1996

Milatovic, D; Jenkins, J.W; Hood, J.E; Yu, Y; Rongzhu, L; Aschner, M. Mefloquineneurotoxicity is mediated by non-receptortyrosinekinase. *NeuroToxicology*, v. 32, p. 578-585, 2011

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. 6ªed. Brasília, 2005

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. 1 ed. Brasília 36 p. 2010

Mota, C.T; Cardoso, P.C.S; Gomes, L.M; Vieira, P.C.M; Corrêa, R.M.S; Santana, P.D.P.B; Miranda, M.S; Burbano, R.M.R; Bahia, M.O. In vitro evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of artesunate, an antimalarial drug, in human lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 52, p. 590-594, 2011

Mota, M.M; Pradel, G; Vanderberg, J.P; Hafalla J.C.R; Frevert, U; Nussenzweig, R.S; Nussenzweig, V; Rodriguez, A. Migration of Plasmodium Sporozoites Through Cells Before Infection. *Science*, v. 291, p. 141-144, 2001

Munzner, R; Renner,H.W. Mutagenicity testing of quinine with submammalian and mammalian systems. *Toxicology*, v. 26 , p. 173-178, 1983

Naim, V; Rosselli, F. The FANCD1 pathway and BLM collaborate during mitosis to prevent micro-nucleation and chromosome abnormalities. *Nature Cell Biology*, v. 11, p. 761–768, 2009

Nam, W; Tak, J; Ryu, J.K; Jung, M; Yook, J.I; Kim, H.J; Cha, I.H. Effects of artemisinin and its derivatives on growth inhibition and apoptosis of oral cancer cells. *Head & Neck*, v. 29, p. 335-340, 2006

Navaratnam, V; Mansor, S.M; Chin, L.K; Mordi, M.N; Asokan, M; Nair,N.K. Determination of artemether and dihydroartemisinin in blood plasma by high-performance liquid chromatography for application in clinical pharmacological studies. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* , v.669, p. 289–294, 1995

Navaratnam, V; Mansor, S.M; Sit, N.W; Grace, J; Li, Q; Olliaro, P. Pharmacokinetics of artemisinin-type compounds. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 39 p.255–270, 2000

Nduka, A.G.W; Tolulope, O.O. Coartemether in Dietary Oil Induces Oxidative Stress and Hepatotoxicity in Albino Rat, *Research*, v. 3, p. 35-41, 2011

Neves, D.P. *Parasitologia Humana* . 11ª Ed . Rio de Janeiro, Atheneu , 2007

Nosten, F; White, N. J. Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 77, p. 181-192, 2007

Nosten, F; ter Kuile, F.O; Luxemburger, C; Woodrow, C; Chongsuphajaisiddhi, T; Kyle, D.E. Cardiac effects of antimalarial treatment with halofantrine. *The Lancet*, v. 341, p. 1054–1056, 1993

Nwanjo, H.U; Okolie, N.J.C; Oze, G; Okafor, M.C. Halofantrine (antimalarial) toxicity in Wister rats: Biochemical evaluation of hepatic dysfunction. *Research Journal of Medicine Sciences*, v. 1, p. 102-105, 2007

Obi, E; Orisakwe, O.E; Asomugha, L.A; Udemezue, O.O; Orish, V.N. The hepatotoxic effect of halofantrine in guinea pigs. *Indian journal of Pharmacology*, v. 36, p. 303-305, 2004

Olliaro, P.L; Haynes, R.K; Meunier, B; Yuthavong, Y. Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. *Trends in Parasitology*, v. 17, p. 122–126, 2001

Olliaro, P.L; Taylor, W.R. Antimalarial compounds: From bench to bedside. *The Journal of Experimental Biology*, v. 206, p. 3753–3759, 2003

Olufemi, M. A; Sheriff, O; Oladele, A. A. Effects of Short Term Administration of Artemether – Lumefantrine on Testicular Functions and Antioxidant Defence in the Rat. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, v. 4, p. 165-170, 2009

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS DRAFT PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test (MNvit), 2009, Disponível em: < <http://www.oecd.org/dataoecd/45/51/43996258.pdf>> Acesso em 15/05/2012

Ortiz, M. P.C; Wei, M. Q. Antitumor activity of artemisinin and its derivatives: from a well-known antimalarial agent to a potential anticancer drug. *Journal of biomedicine and biotechnology*, v. 2012, Artigo ID 247597, 2012

Palmer, K.J; Holliday, S.M; Brogden, R.N. Mefloquine. A review of its antimalarial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, v. 45, p. 430–475, 1993

Picot, S. Is *Plasmodium vivax* still a paradigm for uncomplicated malaria?. *Médecine et maladies infectieuses*, v. 36, p. 406-413, 2006

Plasmodium vivax: are researchers from endemic areas really concerned

Price, R.N; Tjitra, E.; Guerra, C.A; Yeung, S; White, N.J; Anstey, N.M. *Vivax* malaria: neglected and not benign. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 77, p. 79-87, 2007

Price, R; Van Vugt, M; Phaipun, L; Luxemburger, C; Simpson, J; McGready, R; ter Kuile, F; Kham, A; Chongsuphajaisiddhi, T; White, N. J; Nosten, F. Adverse effects in patients with acute falciparum malaria treated with artemisinin derivatives. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 60, p. 547–555, 1999

Qinghaosu Antimalaria Coordinating Group. Antimalarial studies on qinghaosu. Chinese medicine journal, v. 92, p. 811-816, 1979

Rey, L. Parasitologia . 4^a Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008

Ridley, R.G. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. Nature, v. 415, p. 686-93, 2002

Saleri, N; Gulletta, M; Matteelli, A; Caligaris, S; Tomasoni, L.R; Antonini, B; Perandin, F; Castelli, F. Acute respiratory distress syndrome in Plasmodium vivax malaria in traveler returning from Venezuela, v.13, p. 112—113. 2006

Sedelnikova, O.A; Redon, C.E; Dickey, J.S; Nakamura, A.J; Georgakilas, A.G; Bonner, W.M. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. Mutation Research, v. 704, p. 152-159, 2010

Shi, B; Yu, Y; Li, L; Zang, Y; Zhong, S; Su, S; Liang, S. Quantitative Analysis of Artemether and its Metabolite Dihydroartemisinin in Human Plasma by LC with Tandem Mass Spectrometry. Chromatographia, v. 64, p. 523-530, 2006

Silva, I.B.A; Araújo, J.R; Cleonardo, A; Ventura, A.M; Pinto, A.Y; Linonati, R.M.F; Silva Filho, M; Valente, M.I.A; Castro, J.A.A; Souza, J.M;. Severe vivax malaria and non-cardiogenic pulmonary edema. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 36, p.:273, 2003,

Singh, N.P; Lai, H.C. Artemisinin Induces Apoptosis in Human Cancer Cells. Anticancer Research, v. 24, p. 2277-2280, 2004

Singh, N.P; Panwar, V. K. Case Report of a Pituitary Macroadenoma Treated With Artemether . Integrative Cancer Therapies, v. 5, p. 391-395, 2006

Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica em Malária (SIVEP), 2010. Disponível em: <<http://dw.saude.gov.br/malaria>> Acesso em 13/12/2010

Skinner, T.S; Manning, L.S; Johnston, W.A; Davis, T.M. In vitro stage-specific sensitivity of Plasmodium falciparum to quinine and artemisinin drugs. International Journal for Parasitology, v. 26, p. 519–525, 1996

Snow, R.W; Guerra, C.A; Noor, A.M; Myint, H.Y; Hay, S.I. The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria. Nature, v. 434, p. 214 – 217, 2005

Spanos, S; Rice, S; Karagiannis, P; Taylor, D; Becker, D.L; Winston, R.M.L.; Hardy, K. Caspase activity and expression of cell death genes during development of human preimplantation embryos. Reproduction, v. 124, p. 353-363, 2002

Starzengruber, P; Wernsdorfer, G; Parizek, M; Rojanawatsirivet, C; Kollaritsch, H; Wernsdorfer, W.H. Specific pharmacokinetic interaction between lumefantrine and

monodesbutyl-benflumetol in Plasmodium falciparum. Wiener Klinische Wochenschrift, v. 119, p. 60-66 , 2007

Sullivan, D.J; Matile, H; Ridley, R.G; Goldberg, D.E. A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolinas. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 31103-31107, 1998

Torres, F.R; Bonini-Domingos, C.R. Human hemoglobins – malaria hypothesis or maternal effect ?.Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 27, p. 53-60, 2005

Touze, J.E; Heno, P; Fourcade, L; Deharo, J.C; Thomas, G; Bohan, S; Paule, P; Riviere, P; Kouassi, E; Buguet, A. The effects of antimalarial drugs on ventricular repolarization. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 67, p. 54-60, 2002

Uhlemann, A.C; Wittlin, S; Matile, H; Bustamante, L.Y; Krishna, S. Mechanism of Antimalarial Action of the Synthetic Trioxolane RBX11160 (OZ277). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, p.667-672, 2007

van Vugt, M; Looareesuwan, S; Wilairatana, P; McGready, R; Villegas, L; Gathmann, I; Mull, R; Brockman, A; White, N J; Nosten, F. Artemether-lumefantrine for the treatment of multidrug-resistant falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 94, p. 545-8, 2000

Varanda, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais .*Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, v. 27, p.1-7, 2006

Vermehren R; Cardoso, A.D; Bulbol, W.S; Franco, M; Coelho, K; Lorenzi, F; Nunes, V; Gonçalves, J. Report of a case of acute renal failure in Plasmodium vivax malaria. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 27, p. 93-96, 2005

White, N. J. Assessment of the Pharmacodynamic Properties of Antimalarial Drugs In Vivo. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, v. 41, p. 1413-1422, 1997

White, N.J. Preventing antimalarial drug resistance through combinations. *Drug Resistance Updates*, v. 1, p. 3-9, 1998

White N.J; van Vugt, M; Ezzet F. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Artemether-Lumefantrine. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 37, 105-125, 1999

White NJ, Antimalarial drug resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 113, p. 1084–1092, 2004

White, N.J. Cardiotoxicity of antimalarial drugs. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 7, p. 549-558, 2007

White, N.J. Qinghaosu (artemisinin): the price of success. *Science*, v. 320, p. 330-334, 2008

Whote, N.J. Plasmodium knowlesi: The Fifth Human Malaria Parasite. *Clinical Infectious Disease*, v. 46, p. 172-173, 2008

Wongsrichanalai, C; Pickard, A.L; Wernsdorfer, W.H; Meshnick, S.R.O. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infectious Disease*, v. 2, p.209-218, 2002

WORLD HEALTH ORGANIZATION (OMS). Guidelines for the treatment of malaria. 2^a ed. Geneva, 2010

Wu, Y. How might qinghaosu (artemisinin) and related compounds kill the intraerythrocytic malaria parasite? A chemist's view. *Accounts of Chemical Research*, v. 35, p. 255–259, 2002

Zhang, F; Gosser, D.K Jr; Meshnick, S.R. Hemin-catalyzed decomposition of artemisinin (qinghaosu). *Biochemical Pharmacology*, v. 43, p.1805–1809, 1992

Ziegler, A; Leffell, D. J; Kunala, S; Sharma, H.W; Gailani, M; Simon, J.A; Halperin, A.J; Baden, H.P; Shapiro, P.E; Bale, A.E. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 90, p. 4216-4220, 1993

8. ANEXOS

Questionário

Data P.A.: __/__/____

Data do Retorno: __/__/____

Data da Coleta: __/__/____

REGISTRO: _____ PACIENTE ☐ CONTROLE ☐ CÓDIGO: _____

NOME: _____

DATA DE NASCIMENTO: _____ IDADE: _____ NACIONALIDADE: _____

LOCAL DE NASCIMENTO: _____

ENDEREÇO ATUAL: _____

TELEFONE P/ CONTATO: _____

CIDADE: _____ ETNIA: _____

FAZ USO DE HORMÔNIOS: () SIM () NÃO QUAIS?: _____

TEMPO DE USO DE HORMÔNIOS: _____

JÁ TEVE ALGUM TIPO DE CÂNCER?: () SIM () NÃO QUAL?: _____

JÁ FEZ QUIMIOTERAPIA?: () SIM () NÃO POR QUANTO TEMPO?: _____

POSSUI CASOS DE CÂNCER NA FAMÍLIA (tipo de grau de parentesco): _____

FUMA?: () SIM () NÃO HA QUANTO TEMPO?: _____ Nº DE CIGARROS/DIA: _____

JÁ FUMOU?: () SIM () NÃO POR QUANTO TEMPO: _____

HÁ QUANTO TEMPO PAROU DE FUMAR?: _____

CONVIVE COM PESSOAS QUE FUMAM?: () SIM () NÃO

É ETILISTA?: () SIM () NÃO HÁ QUANTO TEMPO?: _____ QUANTO BEBE POR

DIA?: _____

FAZ USO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES: () SIM () NÃO QUAIS?: _____

HÁ QUANTO TEMPO?: _____

FAZ USO DE MEDICAMENTOS: () SIM () NÃO QUAIS?: _____

FAZ OU JÁ FEZ USO DE DROGAS ILÍCITAS: () SIM () NÃO POR QUANTO TEMPO? _____

TEVE ALGUMA VIROSE RECENTEMENTE?: () SIM () NÃO HÁ QUANTO TEMPO FOI

CURADO?: _____

VOCÊ FOI SUBMETIDO A ALGUMA RADIOGRAFIA RECENTEMENTE?: () SIM () NÃO HÁ QUANTO TEMPO

ATRÁS?: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(CONTROLES)

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa que pretende entender melhor as diferentes formas de apresentação da malária causada pelo *Plasmodium vivax* em nosso meio e também identificar em seu sangue, alterações que possam ser provocado pelo parasito ou pela resposta aos remédios que usamos para combater a sua doença. A participação de pessoas sem malária é importante para que nós possamos comparar os resultados com aqueles das pessoas com a doença, por isso você está sendo convidado a colaborar. Para isto, precisamos conversar com você durante alguns minutos, fazer um pequeno exame médico e tirar um pouco de sangue de sua veia, para a realização dos seguintes exames: hemograma, pesquisa de DNA do parasito, exame do DNA de suas células sanguíneas, exame de anticorpos do seu sangue contra o parasito da malária e outros, sempre relacionados à infecção malárica. Não há risco para você nesta pesquisa. Apenas o desconforto do exame médico e da retirada de sangue com agulha, que pode causar um pouco de dor.

Vários exames não serão realizados hoje. Portanto, um pouco do seu sangue ficará devidamente identificado e congelado até o momento da realização do exame. Os resultados, quando estiverem prontos, estarão disponíveis e você poderá consultá-los entrando em contato conosco no endereço abaixo.

Todas as informações obtidas nesta pesquisa serão utilizadas exclusivamente para atender aos objetivos da mesma. As informações e resultados dos exames serão confidenciais, ficando sob o poder dos médicos responsáveis pela pesquisa, os quais garantirão o sigilo dos nomes das pessoas envolvidas.

Os organizadores do projeto serão responsáveis por fornecer orientação e atendimento médico, sempre que necessário.

Você tem o direito de recusar a participação e de retirar-se desse projeto assim que desejar, sem que isso acarrete em impedimento de qualquer natureza para seu seguimento no serviço médico envolvido na pesquisa.

Eu, _____, entendi o que me foi explicado sobre o estudo
e concordo com minha participação (ou com a participação de meu dependente acima

.....
Assinatura do participante (ou do responsável, se menor)

.....
Assinatura do pesquisador principal

Testemunha*

* Testemunha só é exigido caso o participante não possa por algum motivo, assinar o termo.

Data (Cidade/dia mês e ano) _____ de _____ de 20____

Contato: Prof. Dra. Carmen Lucia Bassi

Av. Fernando Correa da Costa, s/n

Universidade Federal de Mato Grosso

Laboratório de Investigação da Faculdade de Ciências Médicas

Bloco do CCBS 3, fone (65) 3615-8856

Para esclarecimentos sobre questões éticas do projeto, entrar em contato com :

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Muller

Av. Fernando Correa da Costa, 2367

Bairro Boa Esperança- Coxipó, Cuiabá (MT)

CCBS I – 1º Piso – Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT)

Telefone : (65) 3615-8254

E-mail: cepahujm@cpd.ufmt.br

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Müller
Registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa em 25/08/97

TERMO DE APROVAÇÃO ÉTICA
DE PROJETO DE PESQUISA

REFERÊNCIA: Projeto de protocolo Nº 993/CEP- HUJM/2011

"COM PENDÊNCIAS"

☐

APROVADO "ad referendum"

☐

APROVAÇÃO FINAL

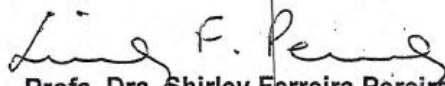
☒

NÃO APROVADO

☐

O projeto de pesquisa intitulado: "**Estresse oxidativo e respostas ao dano no DNA em pacientes com malária,**" encaminhada pelo (a) pesquisador (a) **Carmen Lúcia Bassi** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM, em reunião realizada dia 13/04/2011 que concluiu pela aprovação final, tendo em vista que atende a Resolução CNS 196/96 do Ministério da Saúde para pesquisa envolvendo seres humanos.

Cuiabá, 13 de Abril de 2011.



Prof. Dra. Shirley Ferreira Pereira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM