

ANA CLÁUDIA BOARETO

**EFEITOS DA ARTEMISININA (*Artemisia annua* L.)
NA GESTAÇÃO DE RATAS WISTAR**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia, pelo Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter

**CURITIBA - PR
2007**

Dedico este trabalho aos meus pais,
Oswaldo e Marita, pelo apoio
incondicional; ao meu marido Juarez,
cujo amor e incentivo possibilitaram a
realização desse trabalho e à minha filha
Luiza, que chegou para tumultuar e
alegrar o meu mestrado.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter**, pela orientação e amizade demonstradas em cada ensinamento e conselho;

Às colegas **Aedra Bufalo, Giuliana Kasecker, Juliane Muller e Samanta de Araújo** pelo auxílio na realização dos experimentos e pelo companheirismo e amizade;

À **Prof. Dra. Rosana Nogueira de Moraes**, pelo auxílio na análise hormonal e contribuição com importantes sugestões;

Aos funcionários do **Biotério** do Setor de Ciências Biológicas da UFPR;

Aos professores, funcionários e colegas do **Departamento de Farmacologia** da Universidade Federal do Paraná;

Ao CPQBA/UNICAMP, particularmente à **Mary Ann Foglio**, pela extração e fornecimento da artemisinina;

Aos meus pais, **Osvaldo e Marita**, e aos meus irmãos, **Luiz e Zeca**, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e acreditaram na conclusão desse trabalho;

Ao meu marido **Juarez** que, além da ajuda nos experimentos durante intermináveis fins de semana, sempre me incentivou e apoiou com enorme carinho;

À **Luiza**, minha filha, que com apenas um mês já teve que aprender a dividir a mamãe com o mestrado;

À **FUNPAR, CAPES e Fundação Araucária** pelo apoio financeiro; e

À Deus.

Obrigada!

É bom saber que
não estou pronto para tudo,
mas que por nada troco
o que está por vir.

Wolf Borges

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE GRÁFICOS	ix
LISTA DE SIGLAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 MALÁRIA.....	3
2.1.1 Histórico da malária.....	3
2.1.2 Epidemiologia da malária.....	5
2.1.3 Patologia da malária.....	10
2.1.4 Drogas antimaláricas.....	13
2.1.5 Malária e gestação.....	20
2.2 ARTEMISININA.....	21
2.2.1 Estrutura química da artemisinina.....	23
2.2.2 Mecanismo de ação da artemisinina.....	24
2.2.3 Toxicidade da artemisinina.....	26
2.2.4 Farmacocinética da artemisinina.....	27
2.3 RECEPTORES NUCLEARES PXR E CAR E HORMÔNIOS ESTERÓIDES.....	30
2.3.1 Receptores nucleares PXR e CAR.....	30
2.3.2 Receptores PXR e CAR e Citocromo P 450.....	34
2.3.3 Receptores PXR e CAR e Hormônios esteróides na gestação.....	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL.....	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38

4	MATERIAIS E MÉTODOS.	39
4.1	ANIMAIS.	39
4.2	SUBSTÂNCIA UTILIZADA.	40
4.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS.	40
4.3.1	Experimento 1 - Organogênese.	41
4.3.2	Experimento 2 – Período Fetal.	41
4.4	EXPERIMENTO 1 – EXPOSIÇÃO DURANTE A ORGANOGÊNESE	42
4.4.1	Toxicidade materna.	42
4.4.2	Dados da prenhez.	42
4.4.3	Níveis plasmáticos de progesterona e estrogênio.	42
4.5	EXPERIMENTO 2 – EXPOSIÇÃO DURANTE O PERÍODO FETAL.	43
4.5.1	Toxicidade materna.	43
4.5.2	Dados gerais da prenhez e lactação.	44
4.5.3	Avaliação geral dos descendentes.	45
4.5.4	Avaliação dos descendentes machos.	46
4.5.5	Avaliação das descendentes fêmeas.	48
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.	50
4.7	DESENHO EXPERIMENTAL.	51
5	RESULTADOS	52
5.1	TOXICOLOGIA REPRODUTIVA DA ARTEMISININA NO PERÍODO PÓS-IMPLANTE (ORGANOGÊNESE) – EXPERIMENTO 1.	52
5.1	TOXICOLOGIA REPRODUTIVA DA ARTEMISININA NO PERÍODO PÓS-IMPLANTE (PERÍODO FETAL) – EXPERIMENTO 2.	59
6	DISCUSSÃO.	73
6.1	TOXICOLOGIA REPRODUTIVA DA ARTEMISININA NO PERÍODO PÓS-IMPLANTE (ORGANOGÊNESE) – EXPERIMENTO 1.	75
6.1.1	Toxicidade materna.	75
6.1.2	Dados da prenhez.	76
6.1.3	Dosagens plasmáticas de progesterona.	77
6.2	TOXICOLOGIA REPRODUTIVA DA ARTEMISININA NO PERÍODO PÓS- IMPLANTE (PERÍODO FETAL) – EXPERIMENTO 2.	79
6.2.1	Toxicidade materna.	79

6.2.2	Dados da prenhez e lactação.	79
6.2.3	Desenvolvimento geral dos descendentes.	83
6.2.4	Desenvolvimento sexual dos descendentes.	85
7	CONCLUSÕES.	88
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	89
	ANEXOS.	98
	ANEXOS A – Submissão do artigo: <i>Toxicity of Artemisinin (Artemisia annua L.)</i> <i>in two different periods of pregnancy in Wistar rats.</i>	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribuição mundial da malária	7
Figura 2.	Incidência da malária no Brasil	8
Figura 3.	Mosquito <i>Anopheles</i>	10
Figura 4.	Eritrócito contaminado por <i>Plasmodium falciparum</i>	11
Figura 5.	Ciclo reprodutivo do <i>Plasmodium</i>	12
Figura 6.	Local de ação dos agentes antimaláricos	14
Figura 7.	Quinolonas e antimaláricos relacionados.....	17
Figura 8.	Outros antimaláricos	18
Figura 9.	<i>Artemisia annua</i> L	23
Figura 10.	Estrutura química da artemisinina e derivados	24
Figura 11.	Estrutura do monômero do PXR	31
Figura 12.	Estrutura do CAR	33
Figura 13.	Interações dos xenobióticos e substâncias endógenas na indução do gene das enzimas do CYP	35
Figura 14.	Esquema do protocolo desenvolvido	51
Figura 15.	Embriões viáveis no 14 ^o dia de prenhez após exposição à artemisinina durante a organogênese.....	57
Figura 16.	Alterações estruturais em filhote exposta à artemisinina no período fetal	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Massa absoluta e relativa de órgãos de progenitoras sacrificadas no 14º dia de prenhez expostas à artemisinina nos dias 7 a 13 de prenhez.....	54
Tabela 2.	Dados da prenhez de ratas expostas à artemisinina nos dias 14 a 20 de prenhez	61
Tabela 3.	Variáveis reprodutivas de descendentes machos expostos à artemisinina no período fetal.....	69
Tabela 4.	Massa absoluta e relativa de órgãos de descendentes machos expostos à artemisinina no período fetal.....	70
Tabela 5.	Variáveis reprodutivas de descendentes fêmeas expostas à artemisinina no período fetal.....	71
Tabela 6.	Massa absoluta e relativa de órgãos de descendentes fêmeas expostas à artemisinina no período fetal.....	72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Massa corporal durante a prenhez de ratas expostas à artemisinina nos dias 7 a 13 de prenhez.....	53
Gráfico 2.	Ganho de massa corporal durante a prenhez de ratas expostas à artemisinina nos dias 7 a 13 de prenhez.	53
Gráfico 3.	Implantes uterinos no 14 ^o dia de prenhez em ratas expostas à artemisinina nos dias 7 a 13 de prenhez.....	55
Gráfico 4.	Embriões viáveis no 14 ^o dia de prenhez de progenitoras expostas à artemisinina nos dias 7 ao dia 13 de prenhez.....	55
Gráfico 5.	Percentual de embriões viáveis em relação ao número de implantes uterinos de progenitoras expostas à artemisinina nos dias 7 a 13 de prenhez.....	56
Gráfico 6.	Percentual de perdas pós-implante em ratas expostas à artemisinina nos dias 7 a 13 de prenhez	56
Gráfico 7.	Níveis plasmáticos de progestágenos no 14 ^o dia de prenhez em ratas expostas à artemisinina nos dias 7 a 13 de prenhez. ...	58
Gráfico 8.	Níveis plasmáticos de testosterona no 14 ^o dia de prenhez em ratas expostas à artemisinina nos dias 7 a 13 de prenhez.	58
Gráfico 9.	Massa corporal durante a prenhez de ratas expostas à artemisinina no dias 14 a 20 de prenhez..	59
Gráfico 10.	Ganho de massa corporal durante a prenhez de ratas expostas à artemisinina nos dias 14 a 20 de prenhez	60
Gráfico 11.	Perdas pós-implante em ratas expostas à artemisinina nos dias 14 a 20 de prenhez.	61
Gráfico 12.	Índice de nascimento em progenitoras expostas à artemisinina nos dias 14 a 20 de prenhez.....	62
Gráfico 13.	Índice de viabilidade de descendentes de progenitoras expostas à artemisinina nos dias 14 a 20 de prenhez.	62
Gráfico 14.	Índice de desmame de descendentes de progenitoras expostas à artemisinina nos dias 14 a 20 de prenhez.....	63
Gráfico 15.	Índice de parto de progenitoras expostas à artemisinina nos dias 14 a 20 de prenhez.....	63

Gráfico 16.	Desenvolvimento ponderal no período de lactação de descendentes expostos à artemisinina do período fetal.	64
Gráfico 17.	Descolamento das orelhas em descendentes expostos à artemisinina do no período fetal.	65
Gráfico 18.	Aparecimento de pêlos em descendentes expostos à artemisinina no período fetal.	65
Gráfico 19.	Abertura bilateral dos olhos em descendentes expostos à artemisinina no período fetal.	66
Gráfico 20.	Descida bilateral dos testículos em descendentes machos expostos à artemisinina no período fetal.	68
Gráfico 21.	Separação prepucial completa em descendentes machos expostos à artemisinina no período fetal.	68

LISTA DE SIGLAS

AhR	Receptor aril carbono
CAR	<i>Constitutive Androstane Receptor</i> : Receptor Constitutivo de Androstano
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas
CYP	Citocromo P 450
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
GR	Receptor glicocorticóide
IPA	Índice Parasitário Anual
LOEL	<i>Lowest observed effect level</i> : Menor dose efeitos observáveis
MDR	<i>Multi-drug resistance</i> : Multi-droga resistente
NOAEL	<i>No observed adverse effect level</i> : Dose em que não se observam efeitos adversos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNCM	Programa Nacional de Controle da Malária
PXR	<i>Pregnane Xenobiotic Receptor</i> : Receptor Pregnano Xenobióticos
RNA_m	RNA mensageiro
RXRα	Receptor retinóide x alfa
SERCA	Sarcoendoplasmático Ca ⁺² ATPase
SNPM	Síndrome Neurológica pós-Malária
US EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i> : Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
VDR	Receptor da Vitamina D
WHO	<i>World Health Organization</i> : Organização Mundial da Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A	Acasalamento
ART	Artemisinina
°C	Graus Celsius
De	Desmame
DL₅₀	Dose letal 50%
g	Gramas
gd	Dia de gestação
h	Horas
kg	Quilograma
mL	Mililitro
µL	Microlitro
n	Número de animais por grupo
nº	Número
p	Nível de significância estatística
pdn	Dia pós-natal
%	Percentual
®	Marca registrada
♀	Fêmea
♂	Macho

RESUMO

A malária é uma doença infecciosa, com maior incidência nos países tropicais, causada pelo protozoário *Plasmodium* e transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles*. Hoje a malária é reconhecida como um grave problema mundial, estimando-se que grande parte da população esteja exposta ao risco de contrair a doença. A malária na gravidez é relacionada com significativa mortalidade e morbidade para a mãe e para o feto, constituindo um grande problema de saúde pública. A artemisinina e seus derivados são de grande importância no tratamento da malária resistente à maioria dos outros antimaláricos. No entanto, devido à possibilidade de reabsorção e anormalidades observadas em estudos de reprodução em animais, o tratamento com derivados da artemisinina não é recomendado durante a gravidez, principalmente no primeiro trimestre. O objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade reprodutiva da artemisinina em ratas Wistar prenhas em períodos críticos da gestação, organogênese e período fetal. Para tanto, ratas Wistar prenhas foram tratadas por via oral (gavage) com diferentes doses (7, 35 e 70 mg/kg/dia) de artemisinina dos dias 7 a 13 e 14 a 20 de prenhez. As fêmeas tratadas nos dias 7 a 13 de prenhez foram sacrificadas no 14º de prenhez e foram analisados os seguintes parâmetros: massa dos órgãos (fígado, rins, glândulas adrenais, hipófise, útero e ovários), níveis plasmáticos de progestágenos, número de implantes uterinos, embriões viáveis e perdas pós-implante. No experimento para avaliação do período fetal foram avaliados os índices de nascimento, parto, viabilidade e desmame, perdas pós-implante e a massa corporal das progenitoras. A progênie foi acompanhada diariamente para avaliação do desenvolvimento geral e sexual: descolamento de orelhas, abertura de olhos, aparecimento de pêlos, descida dos testículos ao escroto, separação prepucial, abertura do canal vaginal, dia do primeiro estro e regularidade do ciclo estral. A progênie foi sacrificada em idade adulta para observar se houve interferência permanente da artemisinina em variáveis específicas referentes ao sistema reprodutor masculino e feminino: massa de órgãos (fígado, rins, glândulas adrenais, testículos, epidídimos, próstata, vesículas seminais, útero e ovários), produção espermática, número de espermatozoides e ciclo estral. Apesar de haverem dados indicando decrescente sensibilidade nos efeitos durante o crescimento fetal ou sobrevivência nos estágios avançados de prenhez, os resultados do presente estudo indicam toxicidade nos dois períodos de tratamento. Os dados indicam que o tratamento com as doses de 35 ou 70 mg/kg de artemisinina induz alto percentual de perdas pós-implantes associado a uma tendência de redução nos progestágenos maternos e uma redução significativa nos níveis de testosterona materna. Assim podemos concluir que a administração oral de artemisinina pode afetar o desenvolvimento pós-implante de embriões e fetos, sendo um risco para a normalidade da gestação e desenvolvimento da prole.

Palavras-chave: Artemisinina; Antimaláricos; Malária; Letalidade embrionária; Toxicidade reprodutiva; Ratos Wistar; Prenhez.

ABSTRACT

Malaria is a life-threatening parasitic disease caused by protozoa *Plasmodium sp.* and transmitted by female *Anopheles sp.* mosquito. Malaria is a public health problem in more than 90 countries and 40% of the global population is vulnerable to this potentially deadly disease. Its incidence has increased during the last decade despite efforts to control the disease. This is attributed mainly to the emergence of drug resistance organisms. Malaria infection during pregnancy is a major public health problem in tropical and subtropical regions throughout the world. Artemisinin compounds play an important role in treating multidrug-resistant malaria. Otherwise, the possible resorption and abnormalities observed in animal reproduction studies not recommend artemisinin during the first trimester of pregnancy. The purpose of this study is to investigate the reproductive toxicity of the antimalarial drug artemisinin on pregnant rats during the organogenic and fetal periods by observing the artemisinin effects on the embryo post-implantation and/or the normal development of the concepts. Pregnant Wistar rats were treated by gavage with increasing doses (7, 35 and 70 mg/kg/day) of artemisinin in two critical periods (from days 7 to 13 or 14 to 20) of pregnancy. The pregnant rats that were treated daily from the seventh to the thirteenth gestational days were killed by decapitation on the fourteenth GD. Blood was collected to determine plasma progesterone levels, selected organs were removed and weighed (uterus, ovaries, liver, kidneys, adrenal glands and hypophysis) and the embryos analyzed, it was observed implantations, viable embryos, embryonic death and post-implantation losses. On fetal study were determined gestation length, litter size, live birth index, offspring survival on postnatal day 4, weaning index and post-implantation losses. The females that had not given birth until day 24 of gestation had been sacrificed for observation of number of implantations and losses. The progeny was daily monitored to detect the development and sexual characteristics: ear separation, fur appearance, testicular migration, prepuce separation, vaginal opening, first day estrous and estrus regularity. The progeny was killed in adulthood to check if the substances interfered with the reproductive system by: organs weight (liver, kidneys, adrenal glands, testis, prostate, seminal vesicles, uterus and ovaries), daily sperm production, sperm number and estrus. Despite there is data indicating decreased sensitivity on the effect on fetal growth or survival following dosing in later stages of pregnancy, the results of the present investigation indicate toxicity in both periods of treatment. The result showed that the treatment with 35 or 75 mg/kg of the artemisinin caused high percentages of post-implantation losses associated to a trend in the maternal progesterone reduction and significant maternal testosterone decrease. Thus we can conclude that oral administration of artemisinin can affect the post-implantation development of embryo and fetus, placing at risk the normal gestation and the development of its concept.

Keywords: Artemisinin; Antimalarial drug; Malaria; Embryo lethality; Reproductive toxicity; Wistar rats; Pregnancy.

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa, com maior incidência nos países tropicais, causada pelo protozoário *Plasmodium* e transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles*. A forma mais grave da doença é causada pelo *Plasmodium falciparum* (AVERY *et al.*, 2002). Hoje a malária é reconhecida como um grave problema mundial, estimando-se que 40% da população esteja exposta ao risco de contrair a doença. Segundo a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* – WHO) ocorrem cerca de 300 a 500 milhões de novos casos e mais de um milhão de mortes por ano (WHO, 2006).

A malária na gravidez é relacionada com significativa mortalidade e morbidade para a mãe e para o feto, constituindo um grande problema de saúde pública (McGREADY *et al.*, 1998). As conseqüências da malária incluem anemia materna, neonatos com baixo peso e aumento na mortalidade com aproximadamente 300.000 mortes de fetos e neonatos e 2.500 mortes maternas por ano (LONGO *et al.*, 2006a).

Drogas antimaláricas são utilizadas na gravidez para tratar a infecção e também como profilaxia em áreas endêmicas (LONGO *et al.*, 2006a). Mulheres com malária são tratadas efetivamente em todos os trimestres da gravidez, independente do potencial teratogênico da droga (CLARK *et al.*, 2004).

A artemisinina é um sesquiterpeno trioxana lactona com ponte peróxido, extraída da planta *Artemisia annua* L. (HIEN e WHITTE, 1993). Desde sua descoberta, na China, na década de 70, a artemisinina e seus derivados têm sido utilizados para o tratamento da malária, sendo efetiva, de ação rápida e bem tolerada.

Estudos sobre a toxicologia reprodutiva da artemisinina e seus análogos em modelos animais realizados por Chen *et al.* (1984); *China Cooperative Research Group on Qinghaosu* (1982); Li *et al.* (1988); Xu e Zhang (1996); Clarck *et al.* (2004) e Longo *et al.* (2006) demonstraram graves alterações para o feto, como letalidade embrionária e perdas pré-implante (CLARK *et al.*, 2004; LONGO *et al.*, 2006a). Existem indicações em alguns experimentos de alteração em contagem espermática, mas estas alterações não foram sistematicamente estudadas (WHO, 2003).

Em 2003, a WHO divulgou uma avaliação sobre a segurança dos derivados da artemisinina na gravidez, onde conclui que apesar das pesquisas em humanos não demonstrarem toxicidade durante a gravidez os dados são insuficientes e que evidências de alterações em animais sugerem a necessidade de maiores pesquisas para determinar a segurança desses medicamentos durante a gestação. Ainda na mesma avaliação a WHO relaciona as principais pesquisas clínicas e pré-clínicas que ainda necessitam ser realizadas, entre elas o mecanismo pelo qual os efeitos adversos na gravidez se originam: estudos mais detalhados sobre a natureza dos efeitos tóxicos em embriões e evidências sobre o mecanismo da toxicidade que poderia ser extrapolado para humanos; e se a ação sobre o estado hormonal da progenitora pode ter efeitos diretos sobre o feto.

Diante do exposto, esse trabalho tem o objetivo de avaliar a toxicologia reprodutiva da artemisinina em dois períodos críticos da gestação de ratos Wistar, a organogênese e o período fetal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MALÁRIA

2.1.1 Histórico da Malária

Malária, do latim *mal aria* (mau ar), ou paludismo, *palus* (região úmida, pantanosas) é uma das doenças parasitárias mais prevalentes na história da humanidade (AVERY *et al.*, 2002; SERRA, 2003). A malária é uma doença que acomete o homem desde a pré-história. Apesar da associação com a malária ser incerta existem referências a febres sazonais e intermitentes em textos religiosos e médicos bastante antigos, entre os assírios, chineses e indianos, que relacionavam a doença à punição de deuses e à presença de maus espíritos (DUTRA, 2001). Os registros concretos mais antigos são de 400 a.C. onde o médico grego Hipócrates descreveu detalhadamente as febres intermitentes da malária (AVERY *et al.*, 2002). Hipócrates também foi o primeiro a descartar a superstição e relacionar a doença com o meio ambiente, notando que as febres eram restritas a áreas pantanosas (GARDINER *et al.*, 2004). Depois dele, no século II d.C., diversos médicos gregos e romanos deixaram referências que a doença ocorria em epidemias, comprovadas pela citação: “uma doença horrível que vem todo verão e mata”, ficando conhecida como “Febre Romana” (AVERY *et al.*, 2002).

Durante quase 1.500 anos pouco foi acrescentado ao conhecimento sobre a doença e seu tratamento. Somente no século XVII ocorreu a observação por padres jesuítas da utilização, por populações indígenas da América do Sul, da casca de uma árvore nativa para o tratamento de alguns tipos de febre. O uso dessa casca se

espalhou rapidamente pela Europa, passou a ser conhecido como “pó dos jesuítas”, e a árvore de onde era extraído recebeu o nome de Cinchona. Seu princípio ativo, a quinina, foi isolado em 1820 (DUTRA, 2001). No século XVII a Condessa de Chinchon foi curada de malária utilizando a quinina quando esteve em Lima (Peru), levando a disseminação do seu uso pelo resto do mundo. A quinina ainda é considerada uma droga antimalárica efetiva, embora tenha sido registrada resistência (GARDINER *et al.*, 2004).

No século XVIII a doença recebeu o nome italiano de “*mal aire*” já que época acreditava-se que era causada pelas emanações e miasmas provenientes dos pântanos. Somente no final do século XIX, quando bacteriologistas e patologistas estavam descobrindo as causas de diversas doenças infecciosas é que o conhecimento sobre a malária passou por um período de importantes descobertas (DUTRA, 2001).

Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922), médico francês, foi quem primeiro observou gametócitos no sangue de um soldado francês, na Argélia em 1880 e recebeu o prêmio Nobel em 1907 pela descoberta do papel dos protozoários na doença. Os achados de Laveran foram confirmados em 1883 por Ettore Machiavava e Angelo Celli, pesquisadores italianos. Em 1897, Ronald Ross (1857-1932), médico escocês, descreveu o modo de transmissão da malária em aves através da picada do mosquito *Anopheles*, e em 1898, Batista Grassi (1854-1925), médico italiano, confirmou o mecanismo de transmissão no homem, recebendo o prêmio Nobel em 1902. Em 1948, uma equipe liderada por Shortt e Garnham elucidou o ciclo do parasita (PARAENSE, 2002; SERRA, 2003; GARDINER *et al.*, 2004).

Durante a primeira metade do século XX muitas pesquisas foram dedicadas ao controle da malária, especialmente no sentido de reduzir ou eliminar a presença de criadouros do inseto transmissor. Em outra direção, as dificuldades no fornecimento do quinino durante a Primeira Guerra Mundial estimularam pesquisadores alemães na obtenção de antimaláricos sintéticos, culminando com o desenvolvimento da primaquina (1924), mepacrina (1930) e cloroquina (1934) (DUTRA, 2001). Paralelamente, foram desenvolvidos estudos para a síntese de substâncias com ação inseticida, que apresentaram seu ápice em 1942, com a obtenção por Paul Muller do composto dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), que apresentava grande atividade inseticida, alto poder residual e baixo custo (GARDINER *et al.*, 2004; DUTRA, 2001).

Desta forma, aliando-se medidas de controle do vetor, acesso ao diagnóstico laboratorial e tratamento eficaz e imediato, tornou-se possível obter redução significativa da morbidade e mortalidade decorrente da malária. Porém, ainda hoje a doença se faz presente em cerca de 100 países, especialmente na África, Ásia e Américas Central e do Sul (BUTLER, 1997; DUTRA, 2001).

2.2.2 Epidemiologia da malária

Em 1955 a *World Health Assembly* (Assembléia Mundial da Saúde) adotou o conceito de erradicação da malária, dois anos depois a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* - WHO) lançou uma campanha global para eliminar a doença. Essa campanha erradicou a malária em alguns países e reduziu a incidência em outros. No entanto houve um significativo ressurgimento da malária nos últimos 30 anos (GARDINER *et al.*, 2004).

Mais de 100 anos depois de elucidado o ciclo do parasita da malária a luta para controlar a doença ainda continua, sendo esta uma das doenças que ainda hoje mais causa mortes em todo mundo (BUTLER, 1997).

Hoje a malária é reconhecida como um grave problema de saúde pública no mundo, estimando-se que 40% da população mundial esteja exposta ao risco de contrair a doença, em mais de 90 países (figura 1). Ocorrem cerca de 300 a 500 milhões de novos casos de malária por ano e mais de um milhão de mortes (WHO, 2006).

A malária é encontrada principalmente em áreas tropicais, África abaixo do Sahara, sudeste Asiático, Ilhas do Pacífico, Índia e Américas do Sul e Central (SACHS e MALANEY, 2002). Aproximadamente 90% das mortes por malária ocorrem na África e a maior parte em crianças (WHO, 2006).

A incidência mundial da malária é crescente, principalmente devido ao surgimento de resistência aos fármacos e inseticidas e às alterações sociais e do meio ambiente. Existe uma necessidade urgente por vacinas, novos fármacos e inseticidas para controlar a disseminação (GREENWOOD e MUTABINGWA, 2002).

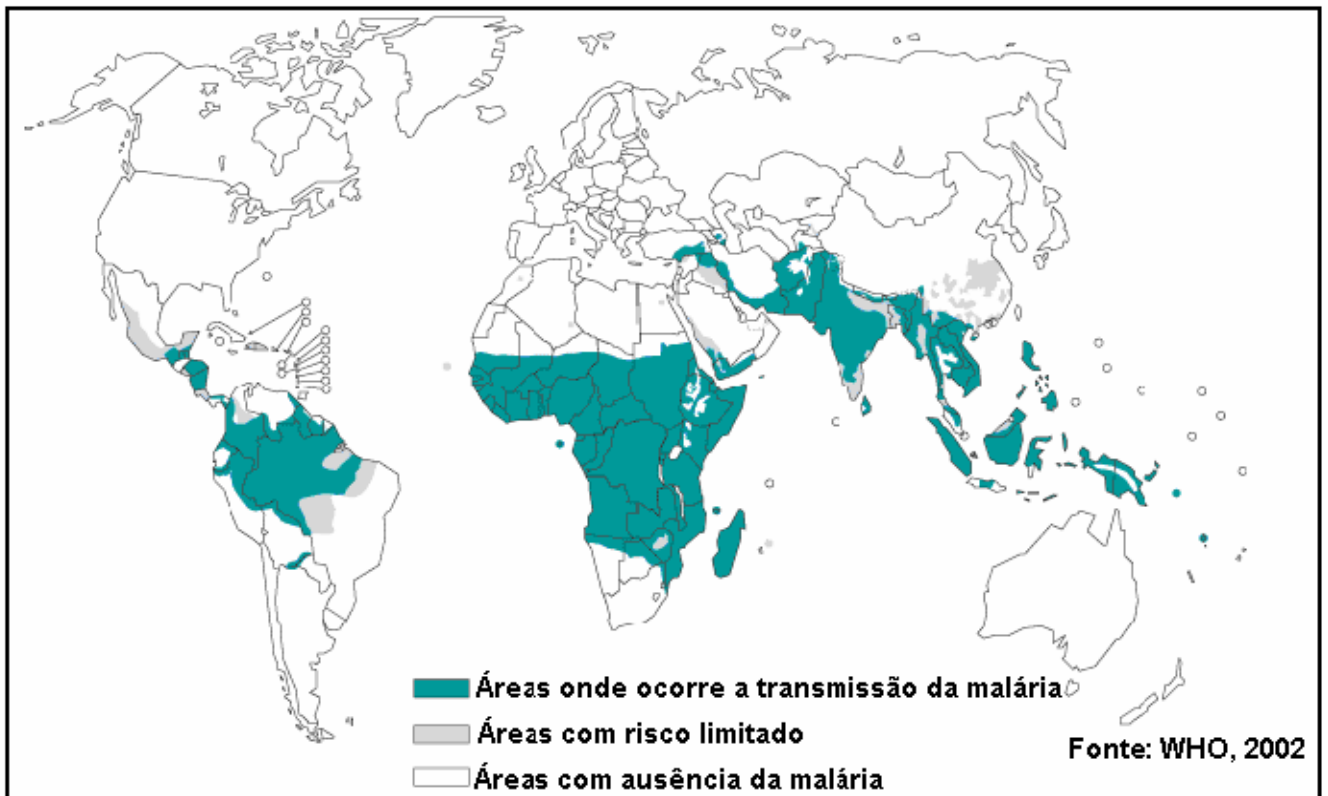


Figura 1: Distribuição mundial da malária

Fonte: WHO, *on line* (2006)

No Brasil, a malária apresenta elevado risco de transmissão na região da Amazônia. Aproximadamente 99% dos casos se concentram nessa região, onde as condições socioeconômicas e ambientais favorecem a proliferação do mosquito vetor da doença e a exposição de grandes contingentes populacionais (figura 2). A doença causa óbitos, sofrimento e perdas sociais e econômicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

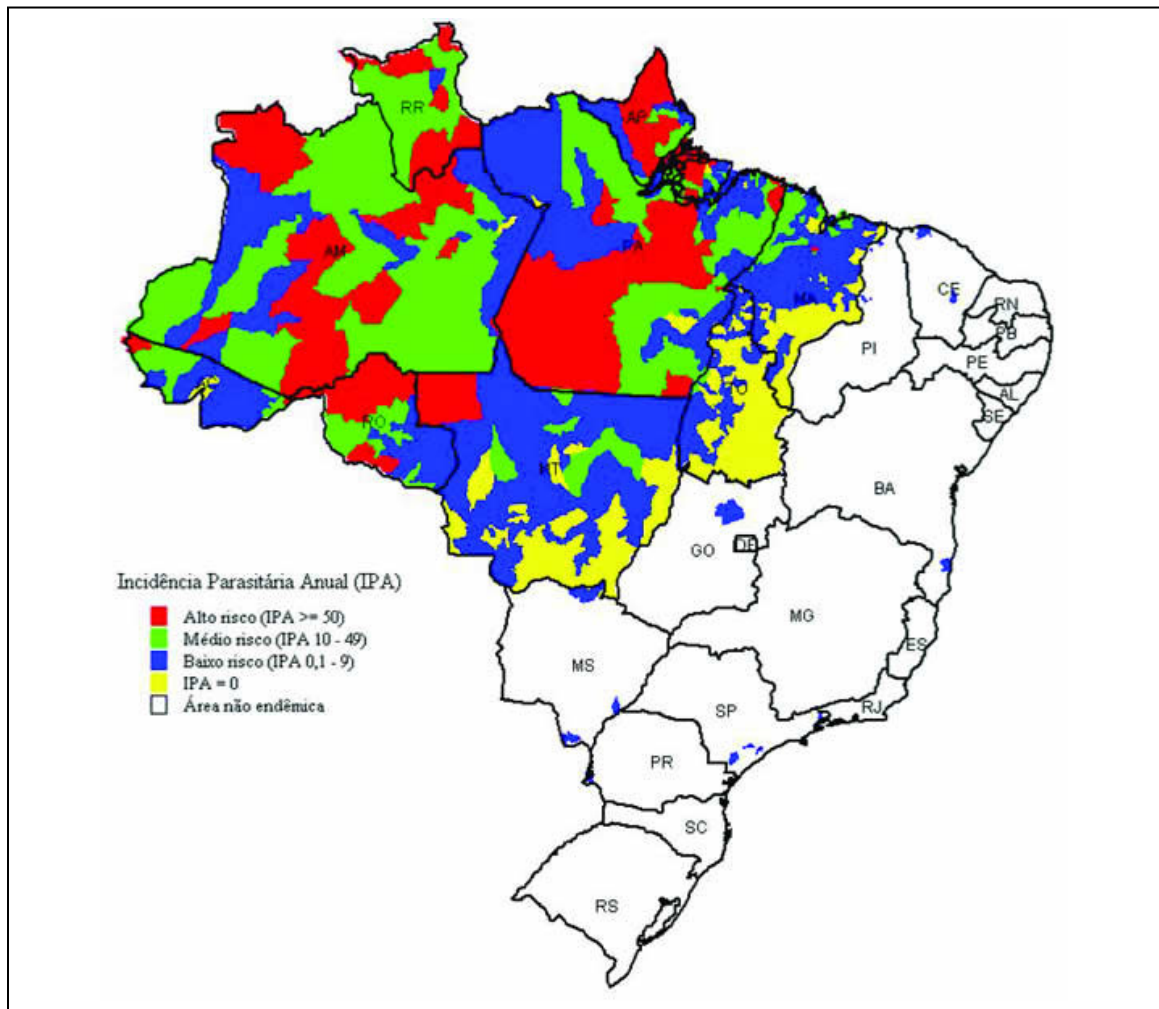


Figura 2: Incidência da malária no Brasil

Fonte: Ministério da Saúde – PNCM (2003)

A doença tem apresentado elevado risco de transmissão, mantendo-se em níveis muito superiores a 1970, quando foram observados 3,9 casos por mil habitantes, na região amazônica. Nos anos de 1999, 2000 e 2001 a Incidência Parasitária Anual (IPA) na região foi de 32, 30 e 19 casos por mil habitantes, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Apesar dos avanços na luta contra a malária, a doença continua em ascensão. Dentre as doenças transmissíveis, a malária hoje é um dos maiores problemas brasileiros, principalmente na região Norte. Nos últimos anos vem sendo

muito alta a velocidade de crescimento de sua taxa de incidência, acompanhando uma tendência mundial.

A transmissão da malária não ocorre com igual intensidade e rapidez em todas as áreas com potencial malarígeno. A dinâmica de transmissão é variável entre os agrupamentos humanos e está na dependência de vários fatores. No Brasil a Amazônia possui características geográficas e ecológicas altamente favoráveis à interação do *Plasmodium* com o *Anopheles*, constituindo uma área de alto risco de infecção. Em contraposição, fora da Amazônia as condições não são muito favoráveis à interação dos fatores que determinam a endemicidade da malária (TAUIL, *et al.*, 1985). O Estado do Paraná, atualmente, é considerado área de baixo risco para malária, porém conserva o potencial malarígeno que dá origem à transmissão eventual. Após o fechamento da barragem de Itaipu, no final de 1982, registrou-se um aumento na densidade *Anopheles* na região e casos de malária passaram a ocorrer. Outras áreas do Estado também merecem atenção, como os municípios e ilhas do Rio Paraná, onde o vetor persiste e os municípios servem de passagem para pessoas oriundas de regiões endêmicas (BÉRTOLI e MOITINHO, 2001).

O aquecimento global pode fazer com que a área de incidência de malária seja expandida no mundo, segundo conclusões prévias do relatório do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climática da Organização das Nações Unidas (ONU) (IPCC - *Intergovernmental Panel on Climate Change*, 2007), regiões do Brasil que praticamente não possuem vetores, como a região Sul, poderão sofrer aumento dos mosquitos.

2.1.3 Patologia da Malária

A malária é uma doença parasitária, transmitida pela picada da fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles* (figura 3). Existem quatro principais espécies de parasitas da malária que infectam humanos, *Plasmodium falciparum* (figura 4), *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*. Recentemente têm sido reportadas infecções com *P. knowlesi* no sudeste da Ásia (GARDINER *et al.*, 2004). As formas mais graves da doença e a maioria das mortes são causadas pelo *P. falciparum*, e também é esta a espécie mais encontrada nas áreas endêmicas, com exceção da Índia e América do Sul, onde o *P. vivax* é mais comum (ASHLEY *et al.*, 2005).



Figura 3: Mosquito *Anopheles* sp.

Fonte: National Institute on Deafness and Other Communication Disorders (NIDCD), *online* (2002). Crédito da foto: Stammers/WHO/TDR

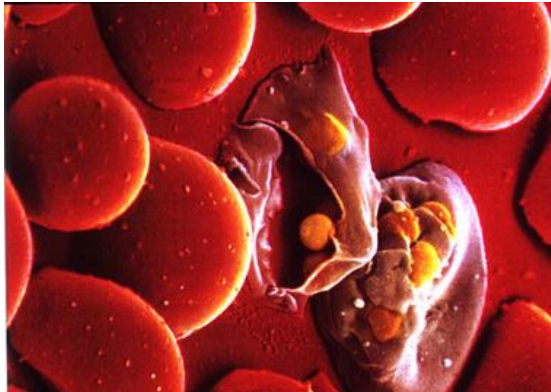


Figura 4: Eritrócito contaminado por *Plasmodium falciparum*

Fonte: Stockbower, *on line* (2006)

Embora a malária possa ser transmitida através da transfusão de sangue infectado e pelo compartilhamento de agulhas, os seres humanos habitualmente se infectam por esporozoítos injetados pela picada do mosquito fêmea infectado (figura 5). Essas formas parasitárias saem rapidamente da circulação e se localizam nos hepatócitos, onde se transformam, multiplicam e se desenvolvem em esquizontes tissulares. Esse estágio é denominado pré-eritrocítico e dura de 5 a 15 dias, dependendo da espécie de *Plasmodium*. Os esquizontes se rompem, liberando milhares de merozoítos que penetram na circulação, invadem os eritrócitos e iniciam o estágio eritrocitário da infecção clínica. Nos eritrócitos a maioria dos parasitas sofre desenvolvimento assexuado até trofozoítos e finalmente até esquizontes maduros. Os eritrócitos contendo esquizontes se rompem liberando de 6 a 24 merozoítos, esse processo causa as crises febris. Os merozoítos liberados invadem mais eritrócitos para perpetuar o ciclo. Alguns parasitas eritrocíticos se diferenciam em formas sexuais, os gametócitos, que são ingeridos pelo mosquito e passam pelo ciclo sexuado. O inseto pode então infectar outro hospedeiro (GOODMAN e GILMAN, 2001; RANG *et al.*, 2003).

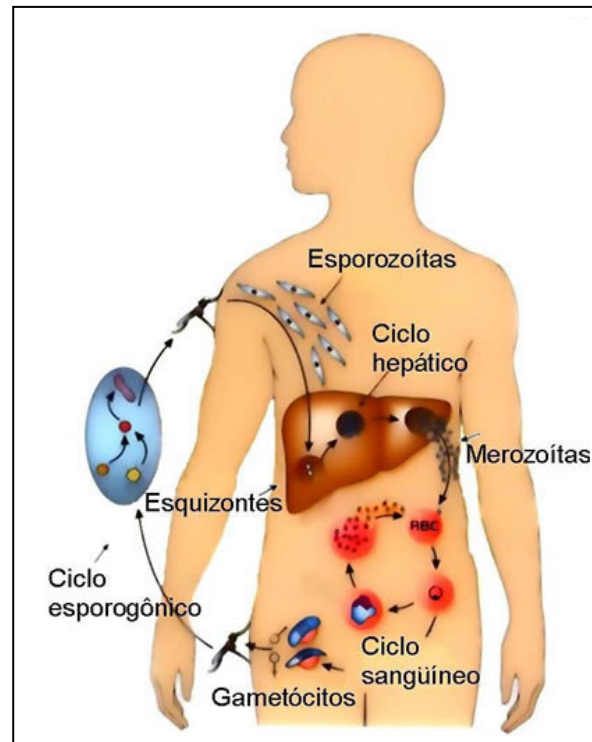


Figura 5: Ciclo reprodutivo do *Plasmodium falciparum*

Fonte: adaptado de Richie e Saul (2002)

O desenvolvimento das manifestações clínicas da malária varia dependendo da espécie de *Plasmodium*.

Sinais e sintomas da malária:

- **Malária não complicada:** os sintomas iniciais não são específicos, como febre, calafrios, perda de apetite e dores pelo corpo, crianças podem apresentar febre mais intensa e outros sintomas. O padrão característico da febre manifesta-se por picos de febre a cada dois dias (febre terçã) ou três dias (febre quartã) (ASHLEY *et al.*, 2005).

- **Malária severa (cerebral):** principalmente relacionada com *P. falciparum*. Mortalidade de aproximadamente 20% dos adultos não grávidos, 15% em crianças e 50% em mulheres grávidas (grande risco de aborto). As principais manifestações são coma, convulsão generalizada, anemia normocítica severa, hipoglicemia, acidose metabólica com disfunção respiratória, distúrbios hidroeletrólíticos, falência renal aguda, edema pulmonar agudo, colapso circulatório, choque, septicemia, icterícia, hemoglobinúria, febre intensa, prostração e perda da consciência (ASHLEY *et al.*, 2005).
- **Síndrome neurológica pós-malária (SNPM):** síndrome neurológica transitória pode seguir a recuperação da malária severa. Os sintomas incluem confusão, tremores e alucinações. O tratamento com mefloquina aumenta o risco de SNPM (ASHLEY *et al.*, 2005).

2.1.4 Drogas Antimaláricas

As drogas antimaláricas estão entre os primeiros fármacos anti-infecciosos a serem avaliados efetivamente em testes clínicos, mas o número de medicamentos viáveis atualmente para o tratamento da malária é baixo (MYINT *et al.*, 2003). Em muitos países endêmicos os medicamentos disponíveis estão restritos a cloroquina, sulfadoxina/pirimetamina, quinina e amodiquina; no sudeste asiático também são utilizados mefloquina e artesunato (OLLIARO e TAYLOR, 2003).

Alguns fármacos antimaláricos podem ser utilizados de modo profilático na prevenção da malária, enquanto outros se destinam a tratar os ataques agudos (GOODMAN e GILMAN, 2001). Em geral, os agentes antimaláricos são classificados

quanto à sua ação contra os diferentes estágios do ciclo de vida do parasita (figura 6).

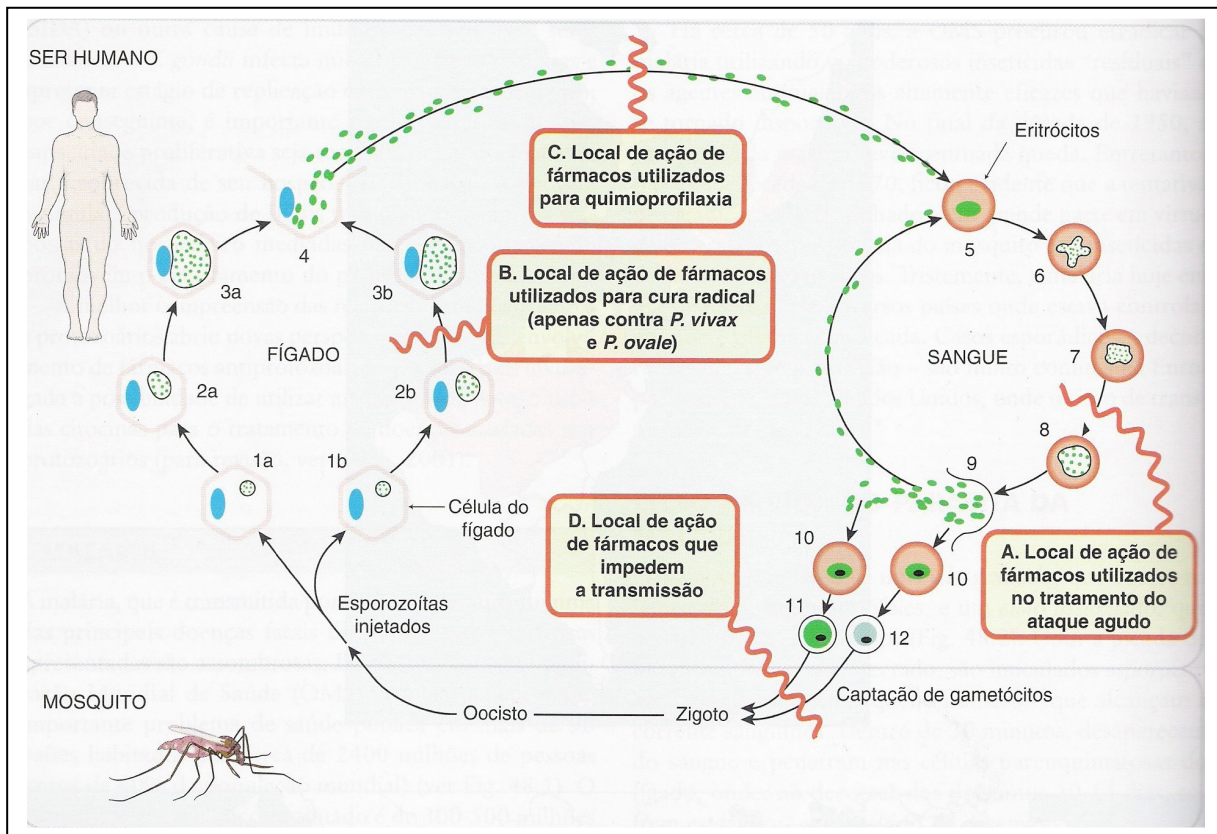


Figura 6: Local de ação dos agentes antimaláricos

Fonte: Rang *et al.*(2003)

Fármacos utilizados no tratamento do ataque agudo

Os agentes esquizotocidas sangüíneos, também conhecidos como fármacos para cura clínica ou supressiva, são utilizados no tratamento do ataque agudo. Atuam sobre as formas eritrocitárias do plasmódio (RANG *et al.*, 2003).

Esse grupo de fármacos inclui as quinolonas, por exemplo, **quinina** e **mefloquina**; várias 4-aminoquinolinas, como a **cloroquina**; a **halofantrina** e agentes que interferem na síntese do folato, como a **sulfona**, ou na sua ação, como a **atovanquona**. Compostos derivados da artemisinina, como o **artemeter**, o

arteeter e o **artesanato** também se mostram eficazes e são freqüentemente utilizados em associação com outros antimaláricos para evitar o aparecimento de resistência. Alguns antibióticos, como a **tetraciclina** e a **doxicilina**, mostram-se úteis em combinação com os agentes anteriormente citados (RANG *et al.*, 2003).

Fármacos que produzem cura radical

Os agentes esquizotomicidas teciduais produzem cura radical ao atuarem também sobre os parasitas no fígado. Apenas as 8-aminoquinolinas, como **primaquina** e **tafenoquina** exercem essa ação. Esses fármacos também destroem os gametócitos e, portanto, reduzem a disseminação da infecção (RANG *et al.*, 2003).

Fármacos utilizados para quimioprofilaxia

Os fármacos utilizados para quimioprofilaxia, também conhecidos como profiláticos causais, bloqueiam a ligação entre o estágio exoeritrocitários e o estágio eritrocitário, impedindo, assim, o desenvolvimento de ataques de malária. Os fármacos utilizados para essa finalidade são principalmente: **cloroquina**, **mefloquina**, **proguanil**, **pirimetamina**, **dapsona** e **doxiciclina** (RANG *et al.*, 2003).

Os agentes quimioprofiláticos são administrados a indivíduos que pretendem viajar para alguma região onde a malária é endêmica (RANG *et al.*, 2003).

Fármacos utilizados na prevenção da transmissão

Alguns fármacos, como a primaquina, proguanil e pirimetamina, apresentam a ação adicional de destruir gametócitos, impedindo a transmissão pelo mosquito e prevenindo, assim, o aumento do reservatório humano da doença (RANG *et al.*, 2003).

O primeiro medicamento com atividade antimalárica comprovada foi a **quinina**, também conhecida como “pó dos Jesuítas”, derivada da casca da quina, uma planta sul-americana. A quinina ainda é considerada uma droga antimalárica efetiva, embora tenha sido registrada resistência (GARDINER *et al.*, 2004). A **mefloquina**, outra quinolona, é utilizada normalmente em associação com o artesunato, para prevenir o surgimento de resistência (RANG *et al.*, 2003). O tratamento com mefloquina pode desencadear síndrome neurológica (GARDINER *et al.*, 2004).

A **cloroquina**, produzida em 1930, foi o antimalárico mais efetivo e com custo acessível, mas o uso indiscriminado como monoterapia levou ao surgimento de resistência. Hoje um dos maiores obstáculos no controle da malária são as cepas de *P. falciparum* resistentes a cloroquina (OLLIARO e TAYLOR, 2003; GARDINER *et al.*, 2004; BARNES e WHITE, 2005). Hoje na África 84% das infecções de malária são tratadas com cloroquina, mesmo quando a droga não é efetiva (GARDINER *et al.*, 2004). A **amodiaquina**, derivada da cloroquina, pode produzir graves efeitos adversos como agranulocitose e hepatotoxicidade, devendo ser restrita a casos de resistência (RANG *et al.*, 2003; ASHLEY *et al.*, 2005).

A **halofantrina** foi desenvolvida durante a 2ª. Guerra Mundial e foi deixada de lado pelas vantagens da cloroquina, hoje está sendo retomada devido à resistência à cloroquina (RANG *et al.*, 2003).

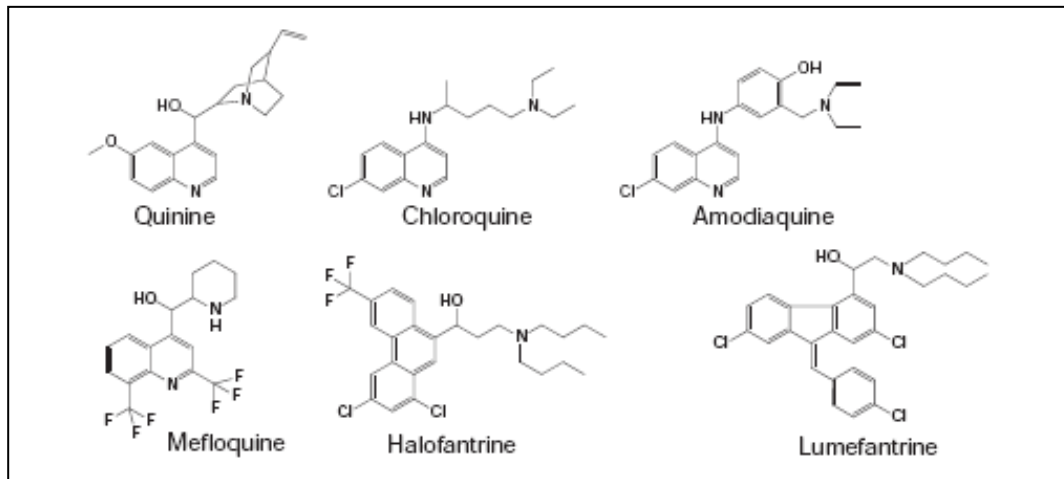


Figura 7: Quinolonas e antimaláricos relacionados

Fonte: Ridley (2002)

Outra geração de antimaláricos muito utilizada e que hoje existe resistência já bastante disseminada é a associação **sulfadoxina-pirimetamina** (Fasindar®) (GARDINER *et al.*, 2004).

Também são utilizados como medicamentos antimaláricos o **proguanil**, **lumefantrina** (utilizada em associação com derivados da artemisinina), **pionaridina**, **doxiciclina**, **clorproguanil-dapsona** (RANG *et al.*, 2003).

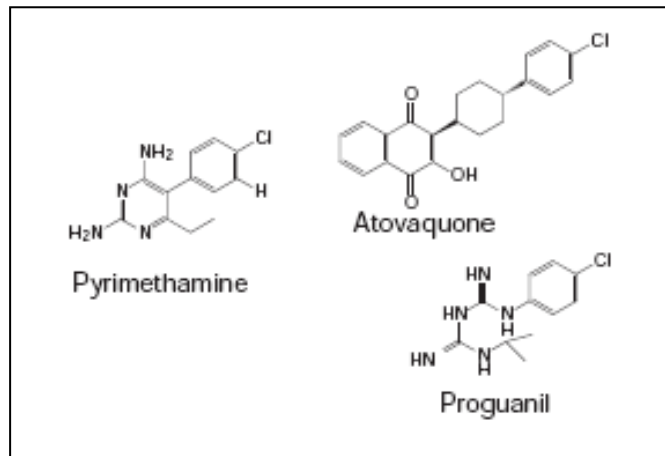


Figura 8: Outros antimaláricos

Fonte: Ridley (2002)

A **artemisinina** e seus derivados semi-sintéticos, **dihidroartemisinina**, **artesunato**, **artemeter**, **arteeter** e **artelinato**, constituem a única classe de antimaláricos que aparentemente não induziu desenvolvimento de cepas de *P. falciparum* resistentes (GARDINER *et al.*, 2004; RANG *et al.*, 2003). São os medicamentos com ação mais potente e rápida contra a malária (NOEDL, 2005). Para reduzir a incidência de resistência, evitar recidivas da doença e acelerar a resposta terapêutica esses medicamentos normalmente são utilizados em associações com outras drogas como a mefloquina e lumefantrina (WILAIRATANA *et al.*, 2002).

Cepas de *P. falciparum* resistentes aos antimaláricos são um grande problema de saúde pública devido à alta incidência de hospitalizações e mortes. Mesmo pequenos níveis de resistência são problemáticos causando anemias, recrudescência e continuidade na transmissão da doença. O *P. falciparum* desenvolveu resistência clinicamente significativa a todas as classes de antimaláricos, com possível exceção dos derivados da artemisinina (BARNES e

WHITE, 2005). A meia-vida curta e utilização em associação da artemisinina e seus derivados dificulta o surgimento de cepas resistentes a esses medicamentos (NOEDL, 2005).

A WHO (2001) considera a associação de medicamentos, principalmente utilizando derivados de artemisinina (lumefantrina-artemeter, mefloquina-artesunato, amodiaquina-artesunato e sulfadoxina/pirimetamina-artesunato), a terapia ideal para reduzir o aparecimento de cepas resistentes de *Plasmodium* (WHITTY *et al.*, 2004). O maior obstáculo na utilização de associações com derivados de artemisinina é o alto custo, a terapia de associação com derivados da artemisinina é a maior esperança no tratamento da malária, mas inacessível para quem precisa (MUTABINGWA, 2005).

Desde 2001, 40 países adotaram oficialmente a terapia com derivados de artemisinina como tratamento de malária por *P. falciparum* (NOEDL, 2005), nas Américas somente Equador, Peru, Bolívia, Venezuela, Guiana e Suriname. O Brasil ainda não adotou oficialmente os derivados da artemisinina como tratamento antimalárico (WHO, 2006), mas a *Artemisia annua* já está sendo produzida e o processo de extração e isolamento da artemisinina já foi otimizado pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas da Universidade de Campinas (CPQBA/UNICAMP) (Rodrigues *et al.*, 2006).

2.1.5 Malária e Gestação

Infecções de malária durante a gravidez é o maior problema de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais no mundo (WHO e UNICEF, 2003). Estima-se que 10,5 milhões de mulheres em idade fértil contraem malária todo ano na região abaixo do Sahara (LONGO *et al.*, 2006a). As conseqüências da malária durante a gestação incluem anemia, nascimentos com baixo peso, morte intra-uterina, nascimentos prematuros, morte da mãe por malária severa, transmissão vertical da doença, alta mortalidade infantil e problemas no desenvolvimento da criança. O risco de mulheres grávidas desenvolverem malária cerebral é de duas a três vezes maior que mulheres não grávidas residentes na mesma área (WHO/UNICEF, 2003).

Por ser uma doença letal a malária deve ser tratada durante a gravidez independente do potencial teratogênico do medicamento (CLARK *et al.*, 2004). O surgimento de cepas resistentes de *Plasmodium* tem levado a um aumento da utilização de derivados da artemisinina, apesar do seu uso não ser recomendado principalmente no primeiro trimestre de gestação devido a poucos registros sobre sua segurança em humanos e evidência de toxicidade em animais de laboratório (CLARK *et al.*, 2004; LONGO *et al.*, 2006a). Derivados de artemisinina são drogas consideradas seguras, mas os estudos são feitos, na maioria das vezes, em pacientes não grávidos e apesar de não haver evidências sobre teratogenicidade ou mutagenicidade em grávidas tratadas os dados são considerados insuficientes (McGREADY *et al.*, 2001).

2.2 ARTEMISININA

O conhecimento popular das propriedades terapêuticas das plantas, que há séculos é transmitido de geração para geração, reúne informação sobre o potencial medicamentoso de várias espécies, constituindo um importante instrumento para o desenvolvimento de novos fármacos. A pesquisa envolvendo as propriedades terapêuticas de plantas tem apresentado resultados científicos positivos, aumentando os estudos com plantas medicinais (SOUZA BRITO, 2003).

Produtos naturais são a base da medicina popular e também, em grande parte, da medicina tradicional. Novos grupos de produtos naturais têm revelado propriedades antiparasitárias com surpreendente eficácia e seletividade, levando a produção de drogas de grande sucesso como a artemisinina e seus derivados (KAYSER *et al.*, 2003).

A artemisinina e seus derivados formam o grupo mais importante de medicamentos antimaláricos da atualidade. Como muitos outros fármacos a artemisinina foi descoberta empiricamente (HAYNES e KRISHNA, 2004).

A artemisinina é extraída da planta *Artemisia annua* L., utilizada na China a mais de 2.000 anos, onde é denominada *qing hao* (AGTMAEL *et al.*, 1999).

A primeira citação do uso do *qing hao* é de 168 a.C., encontrada na tumba da dinastia Mawangdui Han, nas “Receitas para 52 tipos de doenças”, com seu uso recomendado para hemorróidas. A planta também foi mencionada mais tarde no “Livro de Bolso de Prescrições para Tratamento de Emergências” (*Zhou How Bei Ji Fang*), de Ge Hong, para reduzir febre (KLAYMAN *et al.*, 1985). A descrição mais detalhada aparece no “Compêndio de Matéria Médica” (*Ben Cao Gang Mu*),

publicada em 1956 pelo médico da Dinastia Ming, Li Shizhen, famoso herbalista chinês, e impresso até hoje na China (HAYNES e WONWILLER, 1997).

Em 1967 o governo na República Popular da China desenvolveu um exame sistemático das principais plantas utilizadas pela medicina popular, mais de 3.000 plantas foram analisadas, entre elas o *qing hao*, onde sua ação antimalárica foi comprovada (LEE *et al.*, 2002).

Em 1972 o ingrediente ativo foi purificado e denominado *qinghaosu* (essência do *qing hao*) (MESHNICK, 2002). Outros nomes encontrados são *huanghuahaosu*, *artennuin* e *artemisinine*. O nome adotado oficialmente no ocidente foi artemisinin (AVERY *et al.*, 2002).

Em 1979 a artemisinina teve sua estrutura química elucidada (KLAYMAN *et al.*, 1985). Também em 1979, o *Chinese Coordinatin Research Group* realizou o tratamento de 2.099 pacientes com malária utilizando artemisinina, onde todos foram curados. Em adição trataram 143 casos de *P. falciparum* resistente a cloroquina e 141 casos de malária cerebral. Todos foram curados (LEE *et al.*, 2002).

A partir da década de 80 houve a disseminação dessa droga para o ocidente (LEE *et al.*, 2002).

A *Artemisia annua* L. (figura 9) é uma planta perene, nativa da China, pertencente à família Asteraceae ou Compositae e hoje disseminada em muitos países (DHINGRA *et al.*, 2000). A artemisinina é produzida nas folhas e se acumula nas inflorescências, podendo ser extraída de ambos em concentração que varia entre 0,01 a 0,8% do peso seco. A baixa concentração de artemisinina extraída é uma grande limitação para a produção em larga escala, e um dos fatores do alto custo da medicação (JAIN *et al.*, 1996).



Figura 9: *Artemisia annua* L.

Fonte: Yarris, *on line* (2004)

2.2.1 Estrutura química da Artemisinina

A **artemisinina** é um sesquiterpeno trioxana lactona com ponte peróxido. A ponte peróxido, essencial para a atividade antimalárica, não é usual em outros produtos naturais (HIEN e WHITE, 1993). A lactona pode ser reduzida facilmente, resultando em **dihidroartemisinina**, que possui atividade antimalárica aproximadamente 10 vezes maior que a artemisinina (figura 10) (AVERY *et al.*, 2002).

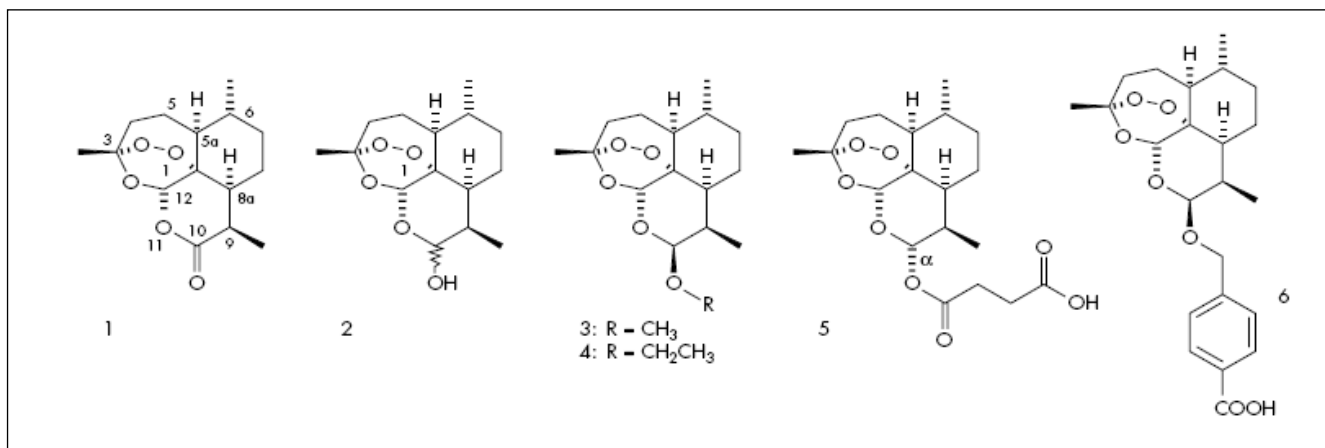


Figura 10: Estrutura química da artemisinina e derivados

1. Artemisinina 2. Dihidroartemisinina 3. Artemeter 4. Arteeter 5. Artesunato 6. Artelinato.

Fonte: Woodrow *et al.*, 2004.

A artemisinina e a dihidroartemisinina são pouco solúveis em água e óleo, sendo utilizadas sob a forma de comprimidos e supositórios. Devido à insolubilidade da artemisinina, impedindo sua administração parenteral, foram desenvolvidos derivados semi-sintéticos mais solúveis (TAVARES, 1999). O **artesunato**, hidrossolúvel, e o **artemeter**, lipossolúvel, foram desenvolvidos por cientistas chineses, para administração intravenosa e intramuscular, respectivamente. O **arteeter**, lipossolúvel, foi desenvolvido pela OMS, e o **artelinato**, hidrossolúvel, pelo *Walter Reed Army Institute of Research* (Walter Reed Instituto de Pesquisa do Exército) (figura 9) (AGTMAEL *et al.*, 1999).

2.2.2 Mecanismo de Ação da Artemisinina

A artemisinina tem ação mais rápida sobre o parasita que os outros antimaláricos porque inibe os estágios iniciais de desenvolvimento do *Plasmodium*, logo que este invade os eritrócitos (HAYNES e KRISHNA, 2004). A maioria dos antimaláricos atua nos estágios de trofozoítos tardios e esquizontes, enquanto a

artemisinina age nos trofozoítos jovens e estágios de anel. Devido a sua ação sobre a forma de anel, a artemisinina impede o desenvolvimento do estágio sexual inicial (gametócitos), resultando em redução da transmissão da malária em áreas endêmicas (AGTMAEL *et al.*, 1999). A artemisinina não atua nos estágios hepáticos do parasita, tendo pouco valor profilático, e aumentando a chance de recrudescência com o uso em monoterapia (WOODROW *et al.*, 2004).

Tentativas para elucidar o mecanismo da ação antimalárica da artemisinina começaram na década de 70, passados mais de 30 anos, um enorme número de artigos foi publicado (WU, 2002). O progresso realizado é grande, mas o mecanismo exato de ação dessas drogas ainda é controverso (UHLEMANN *et al.*, 2005).

Durante a fase sangüínea do parasita, aproximadamente 70% da hemoglobina do eritrócito infectado é digerida e o heme é liberado. O grupamento heme livre é tóxico para o parasita, que realiza sua polimerização em hemazoina. O heme ou o Fe^{+2} catalisa a abertura da ponte peróxido da artemisinina, formando radicais livres tóxicos para o parasita (AGTMAEL *et al.*, 1999). Radicais carbono são a chave inicial para uma cascata de reações químicas que transforma os trioxanos em um ou mais intermediários que levam a morte do parasita da malária (POSNER e O'NEILL, 2004).

Os intermediários da artemisinina formados a partir da abertura da ponte peróxido não agem como radicais livres típicos, que são espécies altamente reativas, reagindo com proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (MESHNICK, 2002). Os intermediários formados possuem toxicidade seletiva contra o parasita, com isso os derivados da artemisinina são drogas pouco tóxicas em doses terapêuticas, o motivo da seletividade e baixa toxicidade da artemisinina ainda não está completamente elucidado (WU e LIU, 2003).

Mais recentemente um mecanismo de ação alternativo para a artemisinina foi sugerido. Os derivados da artemisinina inibem o retículo sarcoendoplasmático Ca^{+2} ATPase (SERCA) do *P. falciparum*, com grande especificidade. A relação com *Plasmodium* ssp ainda está indefinida (UHLEMANN *et al.*, 2005).

2.2.3 Toxicidade da Artemisinina

Derivados da artemisinina têm sido considerados drogas seguras para uso em humanos, embora em estudos com animais existem evidências de **neurotoxicidade**. Essa discrepância entre toxicidade animal e humana é atribuída às doses altas e tratamentos prolongados realizados em estudos animais (GORDI e LEPIST, 2004). A preocupação com a neurotoxicidade da artemisinina é maior em crianças, que possuem o sistema neurológico mais vulnerável e onde as pesquisas terapêuticas são menores (WOODROW *et al.*, 2004).

A **toxicidade reprodutiva** da artemisinina também é contraditória. Apesar de várias alterações encontradas em animais, em humanos ainda não existem evidências de teratogenicidade, mas os estudos são poucos (WOODROW *et al.*, 2004). Não é aconselhável a administração de derivados da artemisinina no primeiro trimestre de gravidez, somente em casos de risco de vida ou resistência (WHO, 2003).

Na China (1982)¹ foram realizados estudos de toxicidade reprodutiva utilizando artemisinina em ratos. Na administração feita nos dias 6 a 15 de prenhez, com as doses² de 50 e 200 mg/kg, houve reabsorção de 100% dos fetos, na dose²

¹ CHINA COOPERATIVE RESEARCH GROUP ON QINGHAOSU AND ITS DERIVATIVES AS ANTIMALARIALS. **J. Traditional Chin. Med.**, v. 2, n. 1, p. 31-38, 1982.

² Doses baseadas na DL₅₀ (dose letal média) da artemisinina em ratos de 5000 mg/kg.

de 12,5 mg/kg houve 50% de reabsorção. Na dose de 200 mg/kg nos dias seis a oito de prenhez foi observada hérnia umbilical em 6,1% dos ratos. Não foi observada alteração no desenvolvimento dos ratos que sobreviveram (*apud* LONGO *et al.*, 2006a).

Vários estudos têm demonstrado que derivados da artemisinina, como o artesunato, o artemeter e a dihidroartemisinina, também demonstraram toxicidade embrionária em diferentes doses e períodos de exposição em ratos, camundongos e coelhos (LONGO *et al.*, 2006a).

A WHO (2003) relatou que existem indicações em alguns experimentos de exposição à artemisinina *in utero* de alteração em contagem espermática, mas essas alterações não foram sistematicamente estudadas.

2.2.4 Farmacocinética da Artemisinina

As formulações orais de artemisinina e derivados são absorvidas rapidamente, mas de forma incompleta. A concentração plasmática máxima ocorre em uma a duas horas e a maioria dos compostos possui meia vida de uma a três horas após a ingestão. Formulações lipossolúveis, administrada por via intramuscular, possuem meia vida maior devido à formação de depósito muscular (AGTMAEL *et al.*, 1999).

Com exceção da artemisinina, após absorção os derivados da artemisinina são convertidos primeiramente em dihidroartemisinina e depois metabolizados pelas enzimas do citocromo P450 e outros sistemas enzimáticos. A dihidroartemisinina é um potente antimalárico, possui tempo de meia vida de 45 minutos e 90% de ligação com proteínas plasmáticas (WOODROW *et al.*, 2004).

Monoterapia com artemisinina e derivados tem sido relacionada com altos índices de recrudescência da doença, um dos fatores é que o pico plasmático reduz a 20-30% dos valores do início do tratamento após o dia cinco com administração diária (AGTMAEL *et al.*, 1999; GORDI *et al.*, 2005). A artemisinina induz seu próprio metabolismo, provavelmente, pela indução enzimática de famílias do citocromo P450 (CYP2C19 e CYP2B6) (SVENSSON e ASHTON, 1999; BURK *et al.*, 2005). Essa indução enzimática pode resultar também em interações com outras drogas, levando-se em conta que a artemisinina normalmente é administrada em associações e a maioria desses medicamentos é substrato do citocromo P450 (GIAO e de VRIES, 2001).

Os receptores nucleares PXR (*Pregnane Xenobiotic Receptor*) e CAR (*Constitutive Androstane Receptor*) medeiam a indução de enzimas do citocromo P450 responsáveis pela metabolização de diversos xenobióticos³ e substâncias endógenas, como hormônios esteróides (KRETSCHMER e BALDWING, 2005). A artemisinina ativa os receptores PXR em humanos e CAR em humanos e camundongos, atuando como agonista desses receptores; e é inibidora do receptor PXR em camundongos. Artemisinina leva a indução das enzimas do citocromo P450 CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4 e o RNAm do gene MDR1 (*multi-drug resistance*). O provável mecanismo de ação da indução enzimática da artemisinina é a ativação dos receptores PXR e CAR, levando ao aumento da sua metabolização, de outras drogas e também de substâncias endógenas (BURK *et al.*, 2005).

Alguns estudos demonstram que infecção por malária modula a expressão e a atividade de enzimas do CYP, reduzindo o metabolismo hepático de medicamentos e outros xenobióticos em humanos e roedores. Experimento

³ Xenobióticos: substâncias químicas estranhas ao organismo.

realizado por Oliveira *et al.* (2006) demonstrou que infecção pelo *P. berghei* induz CYP2A5 e 2E1, enquanto deprime a atividade de outras enzimas do CYP no fígado de camundongos. A modulação da atividade de enzimas de metabolismo hepático em infecções pode malária pode alterar a cinética dos fármacos antimaláricos, modificando seus efeitos farmacológicos e tóxicos (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

2.3 RECEPTORES NUCLEARES PXR E CAR E HORMÔNIOS ESTERÓIDES

Receptores nucleares constituem um grupo de fatores de transcrição ligados ao DNA e sua ação é dependente de interação com ligantes específicos (MÄKINEN *et al.*, 2003).

Os receptores nucleares são muito importantes na farmacologia, mais de 10% dos fármacos atuam modulando a atividade dessas proteínas, como os receptores glicocorticóides (NR3C1) no tratamento de doenças inflamatórias, o receptor androgênico (NR3C4) no câncer de próstata e o receptor estrogênico (NR3A1) no câncer de mama. Além da utilização terapêutica, os receptores nucleares estão implicados no metabolismo dos fármacos e interações medicamentosas, principalmente através dos receptores PXR e CAR (GOODWING e MOORE, 2004).

2.3.1 Receptores nucleares PXR E CAR

O ***Pregnane Xenobiotic Receptor (PXR)*** (figura 11) é um receptor nuclear que detecta substâncias químicas potencialmente tóxicas e regula a expressão de genes para seu metabolismo e eliminação. Os genes regulados pelo PXR envolvem todas as fases do metabolismo das drogas, incluindo enzimas de metabolização de fase I citocromo P450, alelos 3A, 2C e 1A; enzima de metabolização de fase II glutationa-S-transferase⁴ e os genes MDR1 (*multi-drug resistance gene-1*) e MDR2 (*multi-drug resistance gene-1*)⁵ (WATKINS *et al.*, 2003a).

⁴ Glutationa-S-transferase é uma enzima de fase II do metabolismo que catalisa reações de conjugação do substrato com glutationa (GOODMAN e GILMAN, 2001).

⁵ MDR1 e MDR2 são genes de resistência a múltiplas drogas e codificam a P-glicoproteína, que funciona como bomba de efluxo para eliminação de vários fármacos (LINARDI e NATALINI, 2006).

ativação é responsável por uma classe importante e perigosa de interação medicamentosa (WATKINS *et al.*, 2003b; BURK, 2005). Ativação de PXR pode acelerar o metabolismo de outras drogas e reduzir sua eficácia terapêutica (WATKINS *et al.*, 2003a).

O PXR está relacionado com biossíntese, distribuição, metabolismo e eliminação de hormônios esteróides e sua ativação pode ser um fator de desregulação endócrina, mas existem poucos estudos relacionando PXR e desreguladores endócrinos (MIKAMO *et al.*, 2003).

O **CAR (Constitutive Androstane Receptor, NR1I3)** (figura 12) está diretamente relacionado com o metabolismo de diversos xenobióticos e substâncias endógenas, como os hormônios esteróides. Estudos indicam que o CAR está envolvido no metabolismo da bilirrubina, eliminação de ácidos biliares e respostas adaptativas ao estresse nutricional (IKEDA *et al.*, 2005).

O CAR é expresso, principalmente, no fígado e no intestino e seus genes incluem a indução de enzimas do citocromo P450, enzimas de fase II de metabolização e proteínas transportadoras de xenobióticos. A ação do CAR difere dos receptores nucleares clássicos por apresentar atividade constitutiva, independente da interação com ligante. A atividade constitutiva do CAR pode ser revertida por uma classe de compostos conhecidos como agonistas inversos, entre eles estão o androstanol e androstenol (SHAN *et al.*, 2004).

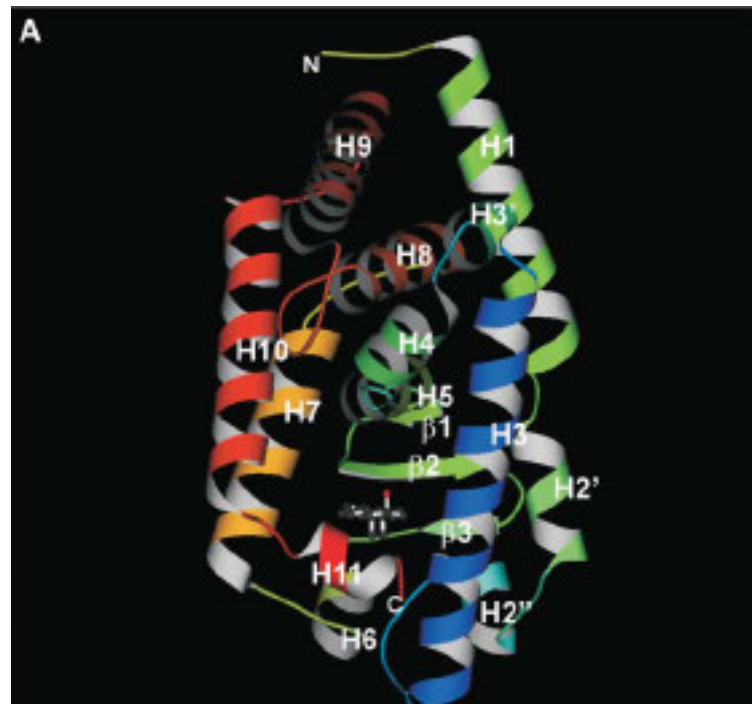


Figura 12: Estrutura do CAR

Fonte: SHAN *et al.* (2004)

O CAR está intimamente relacionado com o PXR e apresenta diversas propriedades semelhantes. CAR e PXR estão envolvidos em eliminar xenobióticos e também no metabolismo e transporte de substâncias endógenas. Ambos os receptores estão presentes em mamíferos, mas somente o PXR está presente em não-mamíferos (KLIOWER, 2002; GOODWING e MOORE, 2004). O CAR e PXR possuem modos de ativação diferentes, sendo que PXR está presente no núcleo e o CAR no citoplasma celular (HANDSCHIN e MEYER, 2005).

Os receptores nucleares mais semelhantes são CAR e PXR, eles possuem aproximadamente 70% de aminoácidos idênticos no sítio de ligação ao DNA e 50% no sítio de interação ao ligante (KLIOWER, 2002).

2.3.2 Receptores Nucleares PXR e CAR e Citocromo P450

As proteínas do citocromo P450 (CYP) formam uma superfamília de enzimas que estão envolvidas no metabolismo oxidativo de compostos lipossolúveis, como hormônios esteróides, ácidos graxos, retinóides, ácidos biliares e substâncias químicas estranhas como fármacos e outros xenobióticos (PASCUSSI, 2002). Nos humanos existem 17 genes já conhecidos de CYP e os três primeiros (CYP1, CYP2 e CYP3) estão envolvidas no metabolismo de drogas e xenobióticos. A desintoxicação mediada por CYP é o mecanismo de defesa pelo qual o organismo se protege de substâncias estranhas hidrofóbicas, que são metabolizadas em substâncias mais hidrossolúveis para serem mais facilmente conjugadas e excretadas. CYP também é importante na biossíntese do colesterol, metabolismo da vitamina D e ácidos biliares e biossíntese e catabolismo de hormônios esteróides (NELSON, 1999).

A expressão dos genes do CYP pode ser modulada por compostos endógenos e xenobióticos de estruturas diversas, que podem ou não ser substratos das enzimas correspondentes (figura 13) (WAXMAN, 1999).

Diversos membros da família dos receptores nucleares, como o CAR, PXR, VDR (receptor da vitamina D), RXR α (receptor retinóide x alfa) e GR (receptor glicocorticóide) são capazes de induzir os genes responsáveis pela expressão das subfamílias CYP2 e CYP3A, mediados por substâncias endógenas ou xenobióticos (PASCUSSI *et al.* 2003). O AhR (receptor aril carbono) é responsável por induzir a expressão da família CYP1 (JACOBS *et al.*, 2003).

No homem, PXR é mediador da indução de CYP3A4, CYP3A7, CYP2B6, CYP2C8 e CYP2C9 (PASCUSSI *et al.* 2003). CYP3A4 é a enzima da família P450

mais abundante no fígado, variando de 30 a 60% das enzimas P450 hepáticas (VIGNATI *et al.*, 2004). CAR é responsável pela indução de CYP2B6, CYP3A4 e CYP2C9 (PASCUSSI *et al.*, 2003).

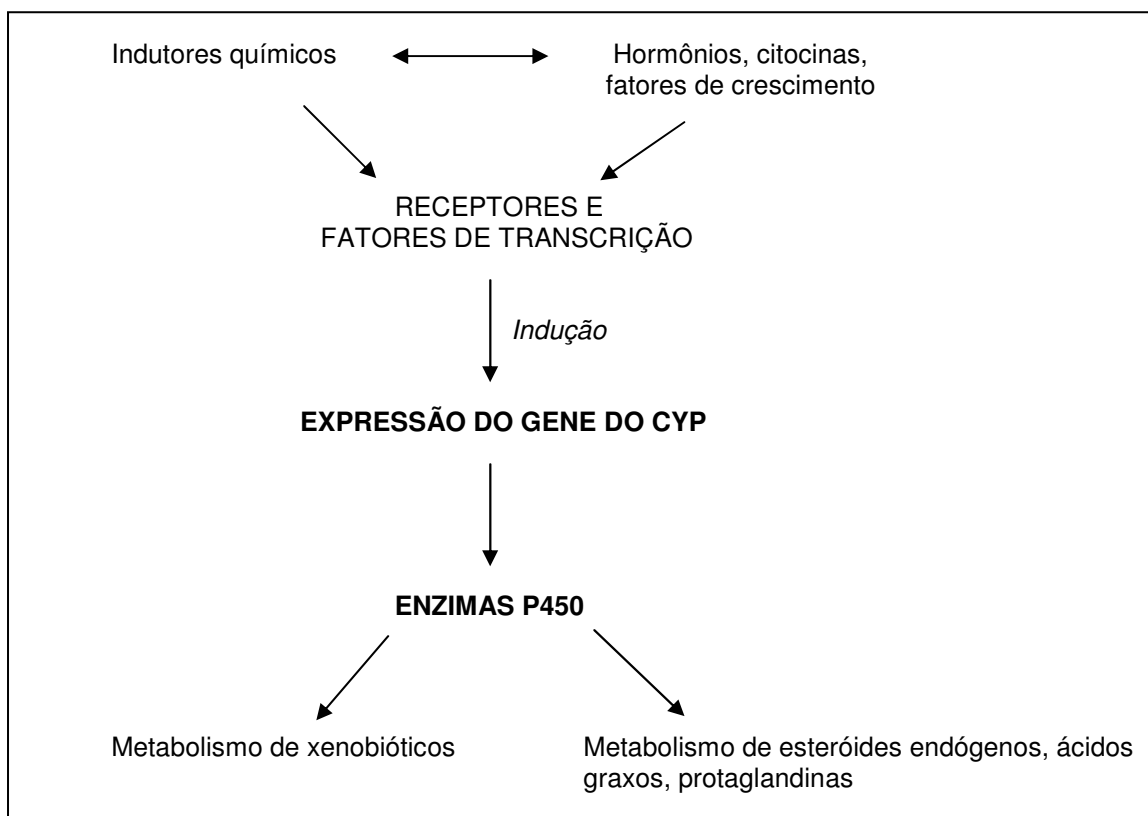


Figura 13: Interação dos xenobióticos e substâncias endógenas na indução do gene de enzimas do CYP

Fonte: adaptação de Waxman (1999)

2.3.3 Receptores Nucleares PXR e CAR e Hormônios esteróides na gestação

Desreguladores endócrinos são compostos capazes de mimetizar, antagonizar, alterar ou modificar a atividade normal hormonal do organismo. Muitos desreguladores endócrinos ativam PXR e CAR e as enzimas do citocromo P450 expressas envolvem a biossíntese, distribuição, metabolismo e eliminação de hormônios esteróides e outros compostos endógenos, e pode ser uma rota importante de desregulação endócrina (MIKAMO *et al.*, 2003; KRETSCHMER e BALDWIN, 2005).

O desenvolvimento sexual e reprodutivo é regulado por androgênios, estrogênios e progesterona. Alterações na biossíntese ou na inativação podem afetar a biodisponibilidade desses hormônios, alterando sua atividade. A conversão metabólica dos hormônios esteróides poder ser uma reação de ativação, como na conversão da testosterona em dihidrotestosterona ou na aromatização de androgênios em estrogênios. Por outro lado, a inativação e eliminação de hormônios pode ocorrer através de reações de hidroxilação, conjugação e oxidação no fígado. Indução das enzimas hepáticas responsáveis por essas reações pode resultar em aumento da metabolização e inativação dos hormônios (YOU, 2004).

Alterações endócrinas nos hormônios esteróides ocorrem naturalmente na gravidez. Os níveis de hormônios produzidos pelo ovário e placenta durante a gravidez são aproximadamente 100 vezes maiores que em mulheres não grávidas. Aumento nos níveis de progesterona é importante para implantação do embrião, relaxamento da musculatura uterina para manutenção da gravidez e proteção da

rejeição tecidual induzida por linfócitos T. Estrogênios são importantes para a implantação do embrião e para o parto (MASUYAMA *et al.*, 2001).

Testosterona e seus metabólitos são importantes durante o período de diferenciação sexual cerebral no feto macho para masculinização e desfeminização do comportamento sexual e desenvolvimento das capacidades reprodutivas (PEREIRA *et al.*, 2003).

Algumas substâncias como nonilfenol e ftalatos, conhecidos como desreguladores endócrinos, ativam PXR e induzem CYP3A em ratos (MASUYAMA *et al.*, 2000; HURST e WAXMAN, 2003). Fenobarbital e fenitoína (anticonvulsivantes), agonistas do CAR, quando administrados na gravidez geram risco de anormalidades no desenvolvimento, como criptorquidia e malformações nos genitais, em humanos machos (KRETSCHMER e BALDWIN, 2005). Rifampicina (antimicrobiano), potente ativador do PXR e indutor do CYP3A, aumenta a metabolização de contraceptivos orais, indicando que aumenta a metabolização de esteróides (ZHANG *et al.*, 1999; LI *et al.*, 1999; YOU, 2004).

Não é certo que um aumento no catabolismo e eliminação de esteróides irá alterar a função desses hormônios, pois sua biodisponibilidade é regulada por vários mecanismos diferentes, mas caso essas alterações ocorram, durante a gestação, poderão ocorrer defeitos irreversíveis no desenvolvimento do feto (YOU, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O estudo tem por objetivo investigar a toxicidade reprodutiva da artemisinina em ratas Wistar prenhas e sua progênie, expostas ao tratamento com artemisinina em períodos críticos da gestação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da artemisinina sobre o estado hormonal de ratas Wistar prenhas tratadas por sete dias consecutivos logo após o implante do embrião, no período da organogênese.
- Avaliar as conseqüências da exposição à artemisinina por sete dias consecutivos em embriões durante o período da organogênese.
- Avaliar o efeito da artemisinina sobre ratas Wistar prenhas tratadas por sete dias consecutivos no período fetal.
- Investigar os possíveis efeitos adversos da artemisinina sobre o desenvolvimento geral e sexual nos descendentes machos e fêmeas de ratas tratadas durante a prenhez.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Nos experimentos foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, criados no biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR. Os animais foram mantidos em salas com temperatura constante ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), obedecendo a fase claro/escuro de 12 horas (luzes acesas das 7 às 19 horas) e recebendo água e ração à vontade. Todos os estudos estiveram de acordo com as normas da Universidade Federal do Paraná para utilização de animais de laboratórios. Número do protocolo de aprovação do comitê de ética: 0157.

Ratas Wistar (n=80) foram acasaladas com ratos machos adultos durante a fase escura do ciclo de luz (12 horas), na proporção de um macho para quatro fêmeas. Foram feitos esfregaços vaginais diários de cada fêmea, realizados com auxílio de micropipeta, através de lavagens vaginais com 50 μL de água destilada e posterior avaliação, a fresco, em microscopia ótica (200x), para verificar a presença de espermatozóides e confirmar a cópula, sendo que o dia de detecção de espermatozóides no esfregaço vaginal é considerado como dia zero da gestação. Os acasalamentos foram repetidos diariamente até a obtenção de um número suficiente de progenitoras para a realização dos experimentos. As fêmeas prenhas foram mantidas em caixas coletivas de polipropileno (414 x 344 x 168 mm), em número de quatro por caixa. O dia do parto foi designado como 1^o dia pós-natal, e os filhotes foram desmamados no 21^o dia de lactação.

4.2 SUBSTÂNCIA UTILIZADA

O medicamento utilizado foi a artemisinina, extraída da planta *Artemisia annua*, fornecida gentilmente pelo CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas) da UNICAMP. A metodologia de extração da artemisinina foi descrito por Rodrigues *et al.* (2006).

4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

As fêmeas prenhas obtidas durante os acasalamentos foram separadas randomicamente em oito grupos. Foram usados grupos experimentais com 10 animais cada.

Quatro grupos (Experimento 1) foram tratados nos dias sete a treze de prenhez, período da organogênese, e as fêmeas sacrificadas no dia catorze, para avaliar massas dos órgãos e níveis hormonais de progestágenos e testosterona. As fêmeas foram tratadas depois do sexto dia para evitar efeito sobre a implantação do ovo (perda pré-implante), que no rato ocorre cinco a seis dias após a fecundação (BERNARDI *et al.*, 2002).

Quatro grupos (Experimento 2) foram tratados nos dias 14 a 20 de prenhez, período fetal, crítico para a diferenciação sexual cerebral, onde ocorre pico de testosterona nos fetos machos (PEREIRA *et al.*, 2003).

Os oito grupos de fêmeas prenhas foram distribuídos em dois experimentos, contendo quatro grupos de dez fêmeas com evidência de prenhez em cada um.

No experimento 1, a artemisinina foi administrada por sete dias durante a organogênese (dias 7 a 13 de prenhez), enquanto que nas fêmeas do experimento 2

foi administrada, também por sete dias, no período fetal (dias 14 a 20 de gestação). Em ambos os experimentos utilizou-se três doses de artemisinina: 7, 35 e 70 mg/kg, sendo que em um grupo de fêmeas de cada experimento utilizou-se placebo, caracterizando assim, o grupo controle.

As doses de artemisinina utilizadas foram baseadas na dose terapêutica em humanos (ALIN *et al.*, 1990; HUNG *et al.*, 1997; ASHTON *et al.*, 1998).

Todos os animais foram tratados por via oral (gavage) com volume de administração de 5mL/kg.

4.3.1 Experimento 1 - Organogênese (n=40)

- a. grupo controle:** (n=10) veículo (tween 80 1% em água destilada)
- b. grupo ART 7:** (n=10) 7 mg/kg/dia de artemisinina
- c. grupo ART 35:** (n=10) 35 mg/kg/dia de artemisinina
- d. grupo ART 70:** (n=10) 70 mg/kg/dia de artemisinina

4.3.2 Experimento 2 - Período Fetal (n=40)

- a. grupo controle:** (n=10) veículo (tween 80 1% em água destilada)
- b. grupo ART 7:** (n=10) 7 mg/kg/dia de artemisinina
- c. grupo ART 35:** (n=10) 35 mg/kg/dia de artemisinina
- d. grupo ART 70:** (n=10) 70 mg/kg/dia de artemisinina

4.4 EXPERIMENTO 1 – EXPOSIÇÃO DURANTE A ORGANOGÊNESE

4.4.1 Toxicidade materna

A massa das progenitoras durante prenhez foi verificado diariamente e o ganho de massa foi registrado percentualmente em relação ao peso do 1º dia de prenhez.

As fêmeas foram sacrificadas no 14º dia de prenhez e foram determinadas as massas dos órgãos (útero, ovários, fígado, rins, adrenais e hipófise).

4.4.2 Dados da prenhez

Após o sacrifício das fêmeas no 14º dia de prenhez o útero foi retirado e foram avaliados os parâmetros de: número de implantes uterinos, embriões viáveis e reabsorções. Os embriões foram observados em lupa para determinação da viabilidade, os embriões em reabsorção se apresentavam sem estruturas definidas, apenas como uma massa disforme.

4.4.3 Níveis plasmáticos de progestágenos e testosterona maternos

Para a determinação dos níveis plasmáticos de progestágenos e testosterona maternos, o sangue dos animais foi coletado após a decapitação da progenitora no dia 14 de prenhez, utilizando heparina como anticoagulante. O plasma foi separado por centrifugação, congelado imediatamente e estocado a -20°C até a análise. Os níveis plasmáticos de progestágenos e testosterona foram determinados por enzima

imunoensaio (MUNRO *et al.*, 1991). Os anticorpos para os progestágenos (pregnane monoclonal CL452 diluição 1:10.000) e para testosterona (anti-testosterona policlonal R156/7 diluição 1:7.500) foram obtidos de Coralie Munro (Universidade da Califórnia, Davis, CA, USA). O CL452 reage de maneira cruzada com vários metabólitos da progesterona, incluindo 4-pregnen-3,20-diona (100%), 4-pregnen-3a-ol-20-ona (188%), 4-pregnen-3b-ol-20-ona (172%), 4-pregnen-11a-ol-3,20-diona (147%), 5a-pregnan-3b-ol-20-ona (94%), 5a-pregnan-3b,20-diona (64%), 5a-pregnan-3,20-diona (55%), 5b-pregnan-3b-ol-20-ona (12.5%), 5-pregnan-3,20-diona (8.0%), 4-pregnen-11b-ol-3,20-diona (2.7%), e 5b-pregnan-3a-ol-20-ona (2.5%). As reações cruzadas para o anticorpo anti-testosterona são: testosterona (100.0%), 5a-dihidrotestosterona (57.4%), androstenediona (0.27%), e androsterona, dehidroepiandrosterona (DHEA), colesterol, estradiol, progesterona e pregnenolona (< 0.05%).

Várias diluições de misturas de plasmas produzem curvas paralelas em relação ao padrão validando o teste. A sensibilidade do ensaio foi de 0,78 e 2,6 pg/poço para progesterona e testosterona, respectivamente. As placas foram lidas com um filtro de 405nm em leitor de microplaca.

4.5 EXPERIMENTO 2 – EXPOSIÇÃO DURANTE O PERÍODO FETAL

4.5.1 Toxicidade materna

A massa das progenitoras durante a prenhez e lactação foi verificado diariamente e o ganho de massa foi registrado percentualmente em relação ao peso do 1º dia de prenhez e lactação, respectivamente. No 18º dia de gestação as fêmeas

foram separadas em caixas individuais. Após o parto as fêmeas permaneceram com os filhotes até o dia 21 pós-natal (período de lactação), quando foram sacrificadas. As fêmeas que não pariram foram sacrificadas no dia 24 de prenhez.

Após o sacrifício foram determinadas as massa dos órgãos (útero, ovários, fígado, rins e adrenais).

4.5.2 Dados gerais da prenhez e lactação

No 21^o. dia da lactação (desmame) as progenitoras foram sacrificadas por decapitação e o útero retirado para a contagem do número de implantes uterinos. Foram determinados a duração da prenhez tamanho das ninhadas e número de filhotes vivos e mortos. Foram calculadas as perdas pós-implantes, a razão sexual e os índices de parto, nascimento, viabilidade e desmame, segundo as fórmulas abaixo:

a. Perdas pós-implantes (%):
$$\frac{\text{n}^{\circ} \text{ de implantes} - \text{n}^{\circ} \text{ de filhotes nascidos vivos}}{\text{n}^{\circ} \text{ de implantes}} \times 100$$

b. Razão sexual (%):
$$\frac{\text{n}^{\circ} \text{ de filhotes machos}}{\text{n}^{\circ} \text{ de filhotes fêmeas}} \times 100$$

c. Índice de parto (%):
$$\frac{\text{n}^{\circ} \text{ de fêmeas que pariram}}{\text{n}^{\circ} \text{ de fêmeas com espermatozóides no esfregaço vaginal}} \times 100$$

d. Índice de nascimento (%): $\frac{\text{n}^{\circ} \text{ de filhotes nascidos vivos}}{\text{n}^{\circ} \text{ de filhotes nascidos}} \times 100$

$\text{n}^{\circ} \text{ de filhotes nascidos}$

e. Índice de viabilidade (%): $\frac{\text{n}^{\circ} \text{ de filhotes vivos no 4}^{\circ} \text{ dia pós-natal}}{\text{n}^{\circ} \text{ de filhotes nascidos vivos}} \times 100$

$\text{n}^{\circ} \text{ de filhotes nascidos vivos}$

f. Índice de desmame: $\frac{\text{n}^{\circ} \text{ de filhotes vivos no desmame}}{\text{n}^{\circ} \text{ de filhotes nascidos vivos}} \times 100$

$\text{n}^{\circ} \text{ de filhotes nascidos vivos}$

4.5.3 Avaliação geral dos descendentes

A 1ª geração de descendentes foi avaliada para as variáveis de desenvolvimento geral:

a. tamanho das ninhadas

b. desenvolvimento ponderal dos filhotes durante a lactação: o desenvolvimento ponderal foi avaliado com a verificação da massa dos descendentes diariamente durante a lactação.

c. viabilidade dos descendentes: filhotes vivos no quarto dia pós-natal.

d. período (dias) para descolamento bilateral dos pavilhões auriculares

e. período (dias) para surgimento de pêlos

f. período (dias) para abertura bilateral dos olhos

4.6.4 Avaliação dos descendentes machos

O desenvolvimento sexual dos descendentes foi avaliado segundo protocolo adaptado da EPA (*Environmental Protection Agency*, 2002).

Em todos os descendentes machos foram avaliados os seguintes parâmetros: desenvolvimento ponderal, descida bilateral dos testículos e separação prepucial completa.

Foram separados três filhotes machos de cada progenitora, que foram sacrificados após 90 dias de vida e foram avaliadas as seguintes variáveis: massa dos órgãos (testículos, epidídimos, próstata, vesícula seminal, fígado, rins e adrenais), produção espermática, morfologia espermática e níveis plasmáticos de testosterona.

a. Desenvolvimento ponderal: O desenvolvimento ponderal foi avaliado tomando-se a massa dos descendentes nos dias 1, 7, 14 e 21 após o nascimento.

b. Descida bilateral dos testículos: Os descendentes machos foram avaliados quanto à descida bilateral dos testículos à bolsa escrotal. O momento da descida dos testículos a bolsa escrotal foi investigado através da palpação diária da bolsa escrotal a partir do 14^o dia pós-natal e subsequente até que todos os descendentes apresentassem essa característica.

c. Separação prepucial completa: A separação prepucial foi investigada diariamente a partir do 33^o dia pós-natal, através da retração manual do prepúcio, até que a separação prepucial estiver completa em todos os descendentes.

d. Peso absoluto e relativo de órgãos: Foram determinados os pesos absolutos e relativos (peso do órgão/peso corporal x 100) dos testículos, epidídimos, próstata, vesícula seminal (com glândulas coaguladoras), fígado e rins. Para órgãos pares (testículos, epidídimos e rins) foi utilizada média entre os lados esquerdo e direito. A retirada e pesagem dos órgãos foram realizadas logo após o sacrifício dos animais por decapitação. A próstata foi pesada sem a cápsula prostática enquanto a pesagem da vesícula seminal foi realizada após a retirada do líquido seminal por perfuração e raspagem.

e. Produção espermática diária e contagem de espermatozóides na cauda do epidídimo: Após a remoção da túnica albugínea, cada testículo foi homogeneizado em 10 mL de cloreto de sódio 0,9% (salina) contendo 0,5% de Triton X-100 em homogeneizador de tecidos por um minuto. O homogeneizado foi diluído dez vezes em salina para a contagem microscópica do número de espermátides resistentes à homogeneização (espermátides nos estágios 17 a 19), em câmara hemocitométrica de Bürker. O número de espermátides por animal, obtido pela soma das contagens do testículo esquerdo e direito, foi dividido por 6,1 dias para a conversão em produção espermática diária. Esse divisor (6,1) corresponde ao número de dias do epitélio seminífero em que as espermátides nos estágios 17 a 19 estão presentes. Para a contagem do número de espermatozóides, as caudas dos epidídimos foram

cortadas em pequenos pedaços, homogeneizadas e processadas da mesma forma que os testículos.

f. Morfologia espermática: Para avaliar o percentual de espermatozoides morfológicamente anormais, uma suspensão de espermatozoides foi obtida através da lavagem da luz do ducto deferente com 0,5 mL de cloreto de sódio 0,9%. Uma alíquota dessa suspensão foi utilizada para confecção de esfregaço, que foi corado com Vermelho Congo e Violeta Genciana. Duzentos espermatozoides por animal foram analisados microscopicamente em aumento de 400x, sendo registrados o percentual total de espermatozoides com defeitos de cauda e/ou cabeça.

g. Níveis plasmáticos de testosterona: Para a determinação dos níveis plasmáticos de testosterona, o sangue dos animais foi coletado por decapitação, utilizando heparina como anticoagulante. Após centrifugação, o plasma foi separado e mantido a -20°C até o momento da análise. Os níveis plasmáticos de testosterona foram dosados por enzima imunoensaio como descrito na análise hormonal materna (4.5.1).

4.6.5 Avaliação das descendentes fêmeas

a. Desenvolvimento ponderal: O desenvolvimento ponderal foi avaliado tomando-se a massa dos descendentes nos dias 1, 7, 14 e 21 após o nascimento.

b. Abertura do canal vaginal: A partir do 30º dia pós-natal, as descendentes foram examinadas diariamente para registro do dia da completa abertura do canal vaginal.

c. Primeiro estro e regularidade do ciclo estral: A partir do dia da abertura completa do canal vaginal, foi realizado, diariamente, o esfregaço vaginal, para a observação, em microscopia ótica (aumento de 200x), dos tipos celulares do epitélio vaginal, para o registro do dia do primeiro estro e avaliada a regularidade do ciclo estral, observando o tempo (dias) entre dois estros consecutivos durante cinco estros (quatro ciclos completos).

A avaliação do esfregaço vaginal foi baseada nos seguintes critérios histológicos: **proestro:** predominância de células epiteliais nucleadas, **estro:** células epiteliais cornificadas, **metaestro:** presença tanto de células epiteliais cornificadas quanto de leucócitos, **diestro:** predominância de leucócitos (CHAHOUUD e KWASIGROCH, 1977; EPA US, 1996; EPA US, 2000).

As fêmeas que não completaram quatro ciclos sexuais foram eliminadas.

d. Variáveis reprodutivas: As descendentes fêmeas foram sacrificadas por decapitação, no dia do 5º estro, sendo então retirados: útero, ovários, fígado, rins e adrenais para registro das massas. O útero foi seccionado logo acima da junção com a cérvix e na junção dos cornos uterinos com os ovários, sendo registrada a massa com conteúdo. Para os órgãos pares (ovários e rins) foi reportada a média das massas.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis com medidas intervalares e que apresentaram distribuição normal foram analisadas através de análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste de Tukey. As variáveis dos descendentes foram analisadas pelo teste-t ou Mann-Whitney. As variáveis indicadas como índices ou percentuais foram analisadas pelo teste do qui-quadrado, com exceção das massas relativas de órgãos, que também foram analisadas através de ANOVA seguido de Tukey. O nível de significância estatístico utilizado foi de 5% ($p < 0,05$). Para análise estatística e confecção dos gráficos foi utilizado o programa Graphpad Prism® versão 3.0.

4.7 DESENHO EXPERIMENTAL

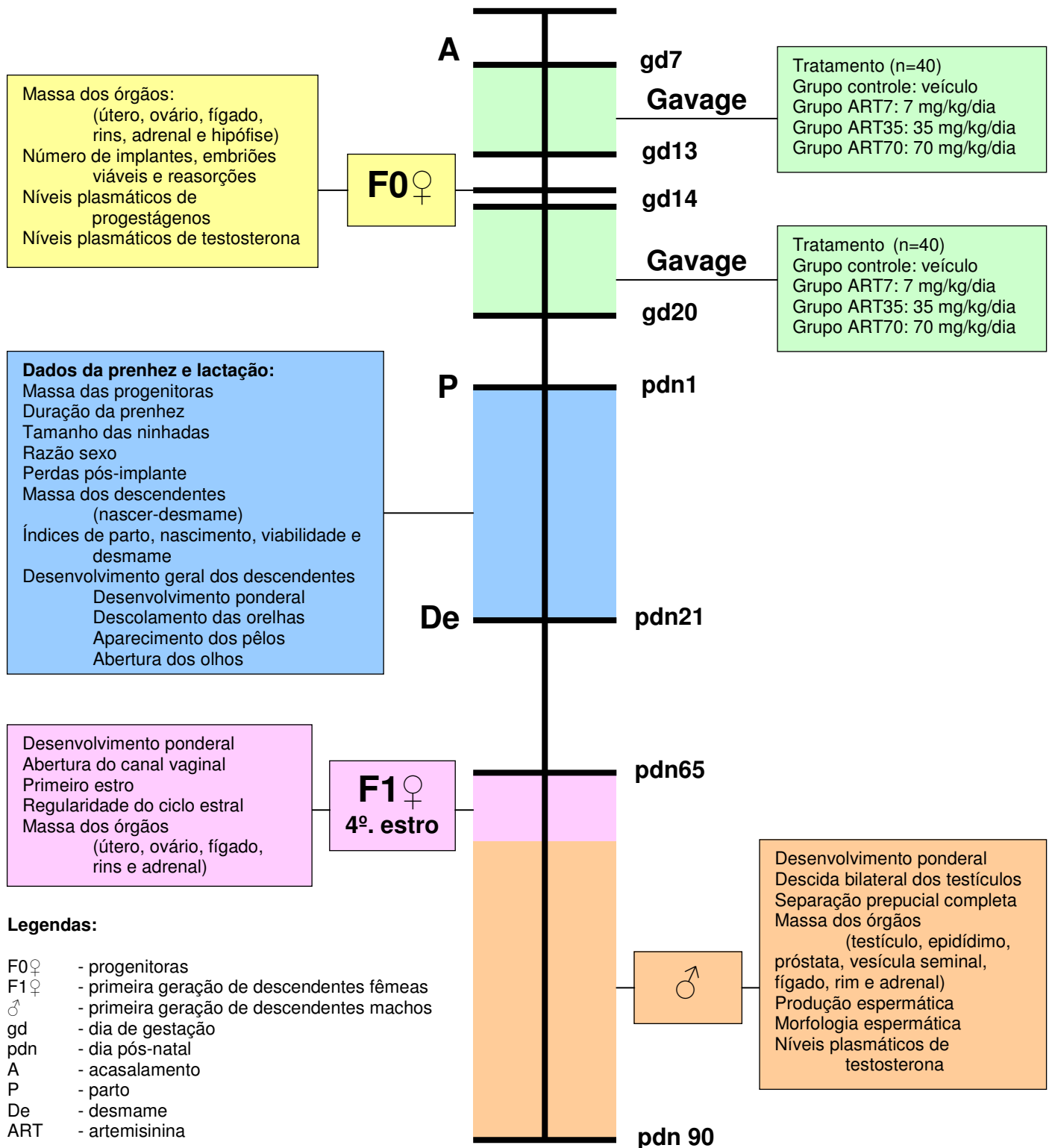


Figura 14: Esquema do protocolo desenvolvido

Fonte: baseado em EPA (2002)

5 RESULTADOS

5.1 TOXICOLOGIA REPRODUTIVA DA ARTEMISININA NO PERÍODO PÓS-IMPLANTE (ORGANOGENESE) – EXPERIMENTO 1

A administração de artemisinina não interferiu na massa corporal das progenitoras (gráfico 1). No ganho de massa corporal (percentual de ganho de peso em relação ao 1º dia de prenhez) (gráfico 2) das progenitoras até o 14º dia de prenhez houve uma redução nas ratas dos grupos tratados com 35 e 70 mg/kg de artemisinina com relação ao controle, a partir do início do tratamento, mas esses valores não foram estatisticamente significante.

O tratamento com artemisinina não afetou as massas absolutas e relativas dos órgãos (ovários, útero, fígado, rins, adrenais e hipófise) em nenhuma das doses testadas (tabela 1).

Não houve diferença significativa entre o número de implantes das fêmeas tratadas com as diferentes doses de artemisinina e as tratadas com o veículo (gráfico 3). Da mesma maneira não houve alteração entre o número de embriões viáveis e reabsorções das mães controle e tratadas com a dose de 7 mg/kg/dia. Entretanto, todos os embriões das mães tratadas com as doses de 35 e 70 mg/kg/dia foram reabsorvidos (gráficos 4 a 6). Os embriões considerados em reabsorção apresentavam aparência de massa disforme, observada em lupa; nos embriões viáveis era possível a observação do embrião íntegro (figura 15).

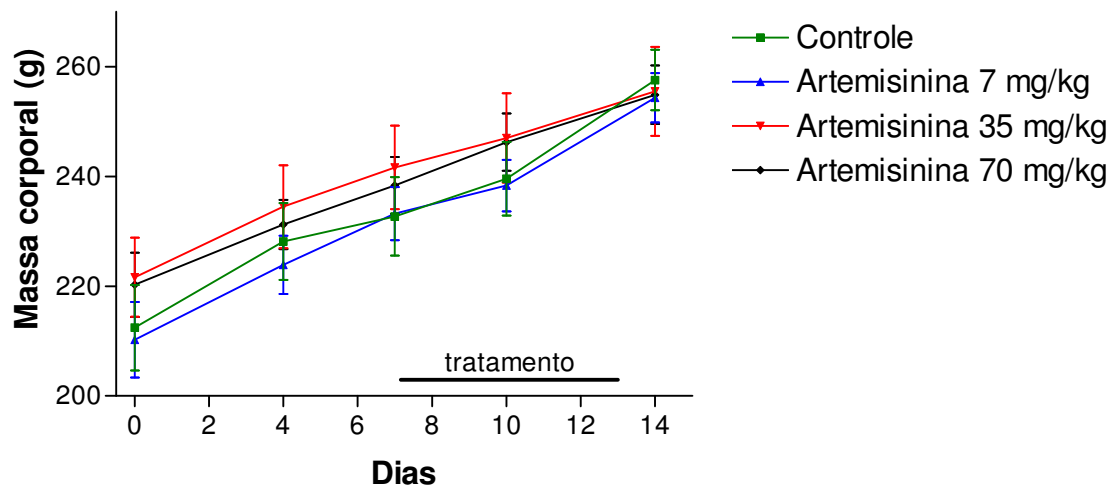


Gráfico 1: Massa corporal durante a prenhez de ratas expostas à artemisinina nos dias 7 a 13 de prenhez

NOTAS: Grupo controle: 7 animais. Grupo ART 7: 9 animais. Grupo ART 35: 8 animais. Grupo ART 70: 8 animais. Os resultados expressam média \pm erro padrão.

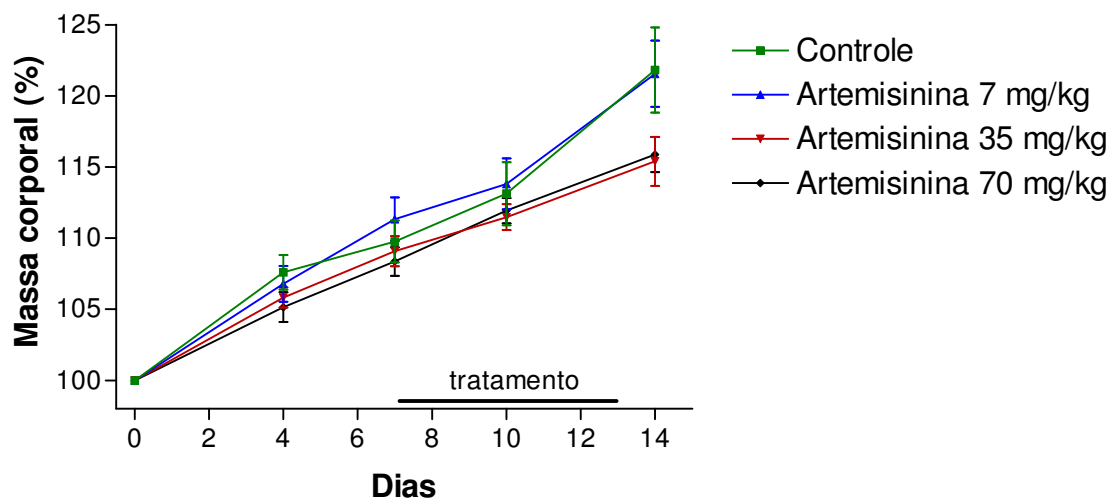


Gráfico 2: Ganho de massa corporal durante a prenhez de ratas expostas à artemisinina nos dias 7 a 13 de prenhez

NOTAS: Grupo controle: 7 animais. Grupo ART 7: 9 animais. Grupo ART 35: 8 animais. Grupo ART 70: 8 animais. Os resultados expressam média \pm erro padrão.

Tabela 1 - Massa absoluta e relativa de órgãos de progenitoras sacrificadas no 14^o dia de prenhez expostas à artemisinina nos dias 7 a 13 de prenhez

VARIÁVEIS	CONTROLE	ARTEMISININA (mg/kg)		
		7	35	70
Fêmeas com evidência de prenhez	10	10	10	10
Progenitoras	7	9	8	8
Massa corporal (g)	258 ± 5,51	254 ± 4,51	256 ± 8,10	255 ± 5,33
MASSA ABSOLUTA				
Útero (g)	5,78 ± 1,24	6,85 ± 0,76	4,23 ± 0,88	4,25 ± 0,77
Ovários (mg)	49,3 ± 3,14	51,0 ± 3,83	53,4 ± 2,32	57,8 ± 3,11
Fígado (g)	10,4 ± 0,26	10,7 ± 0,33	10,3 ± 0,43	10,9 ± 0,48
Rins (mg)	845 ± 31,7	828 ± 16,0	833 ± 38,0	830 ± 34,0
Adrenal (mg)	34,8 ± 2,10	37,3 ± 2,85	32,4 ± 1,96	28,3 ± 2,02
Hipófise (mg)	11,6 ± 0,95	9,44 ± 0,88	10,13 ± 1,01	8,38 ± 1,16
MASSA RELATIVA				
Útero (%)	2,26 ± 0,49	2,69 ± 0,28	1,61 ± 0,32	1,61 ± 0,29
Ovários (%)	0,019 ± 0,001	0,020 ± 0,001	0,021 ± 0,001	0,022 ± 0,001
Fígado (%)	4,03 ± 0,09	4,22 ± 0,15	3,98 ± 0,07	4,14 ± 0,18
Rins (%)	0,33 ± 0,011	0,33 ± 0,004	0,32 ± 0,008	0,31 ± 0,010
Adrenal (%)	0,014 ± 0,001	0,015 ± 0,001	0,012 ± 0,001	0,011 ± 0,001
Hipófise (%)	0,004 ± 0,0003	0,003 ± 0,0003	0,004 ± 0,0004	0,003 ± 0,0004

NOTAS: Os resultados expressam a média ± erro padrão.

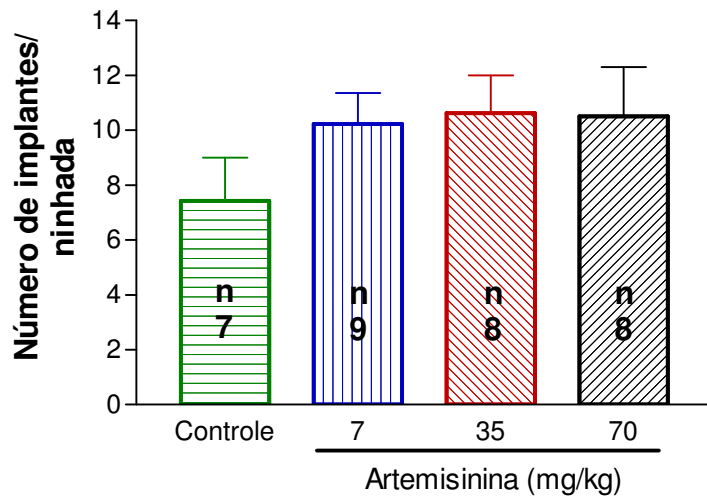


Gráfico 3: Implantes uterinos no 14^o dia de prenhez em ratas expostas à artemisinina nos dias 7 a 13 de prenhez

NOTAS: Os resultados expressam média \pm erro padrão. n = número de animais por grupo.

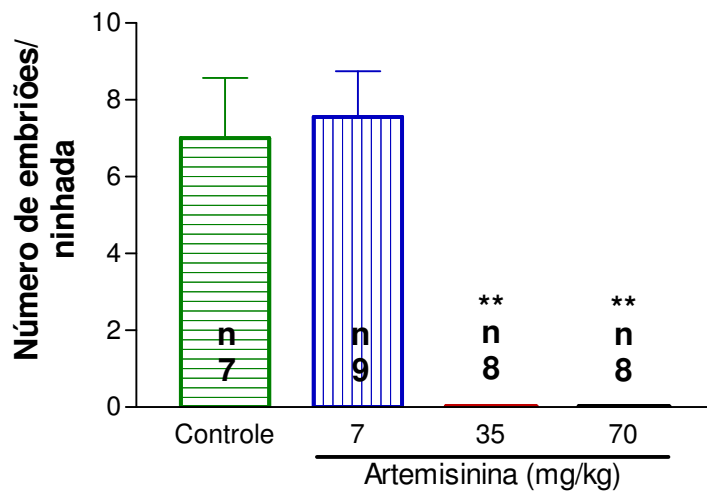


Gráfico 4: Embriões viáveis no 14^o dia de prenhez de progenitoras expostas à artemisinina nos dias 7 a 13 de prenhez

NOTAS: n = número de animais por grupo. Os resultados expressam média \pm erro padrão. ** Significativamente diferente do grupo que recebeu apenas veículo ($p < 0,01$) – ANOVA seguido do teste de Tukey.

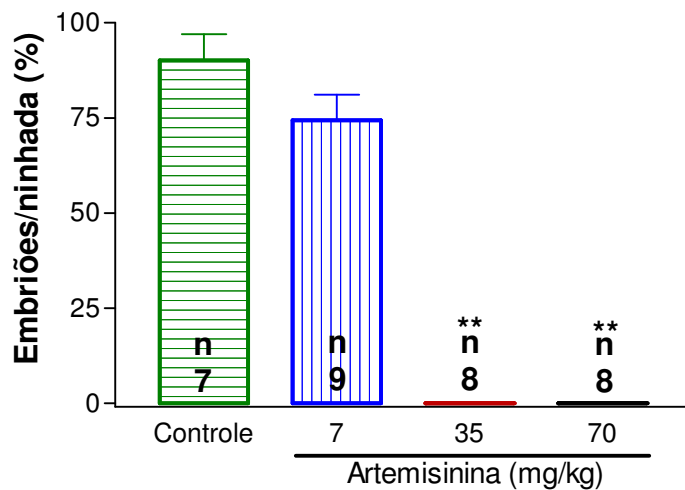


Gráfico 5: Percentual de embriões viáveis em relação ao número de implantes uterinos de progenitoras expostas à artemisinina nos dias 7 a 13 de prenhez

NOTAS: n = número de animais por grupo. Os resultados expressam média \pm erro padrão.

** Significativamente diferente do grupo que recebeu apenas veículo ($p < 0,01$) – ANOVA seguido do teste de Tukey.

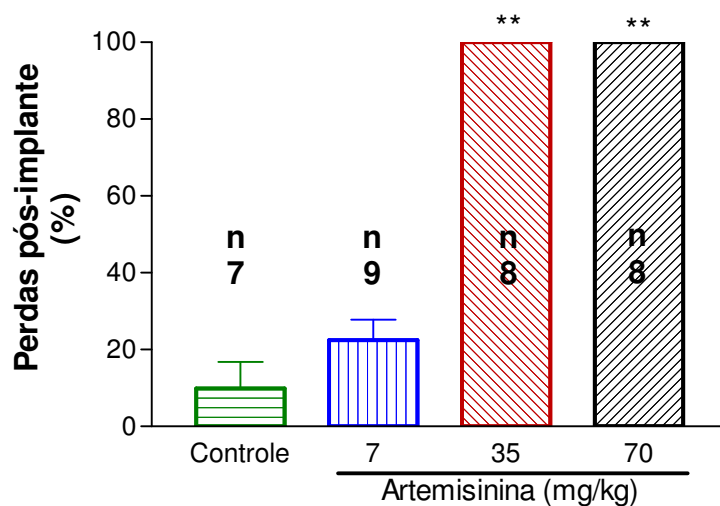


Gráfico 6: Percentual de perdas pós-implante em ratas expostas à artemisinina nos dias 7 a 13 de prenhez

NOTAS: n = número de animais por grupo. Os resultados expressam média \pm erro padrão.

** Significativamente diferente do grupo que recebeu apenas veículo ($p < 0,01$) – ANOVA seguido do teste de Tukey.

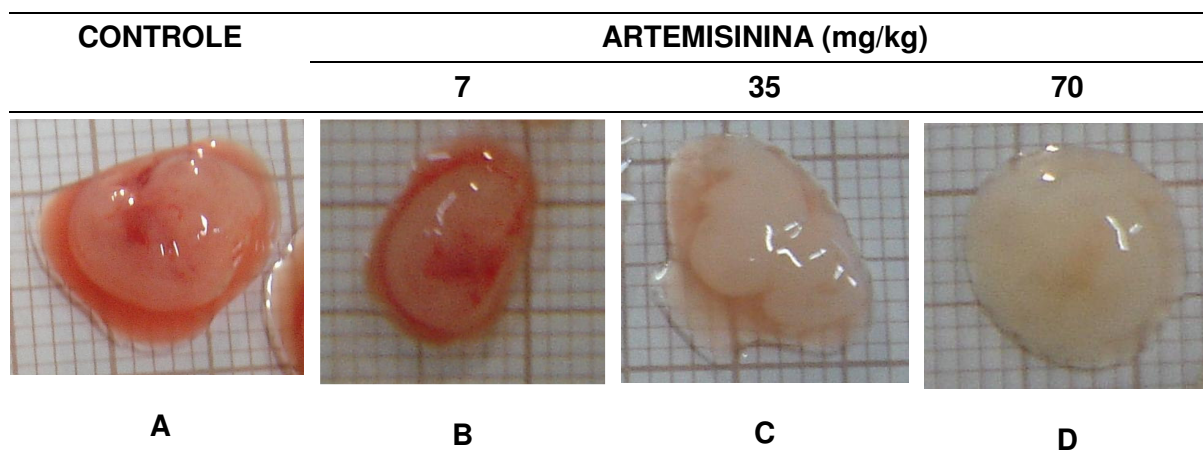


Figura 15: Embriões no 14^o dia de prenhez após exposição à artemisinina durante a organogênese

NOTAS: A e B – embriões viáveis. C e D – embriões em reabsorção.

Os níveis plasmáticos de progestágenos dosados após o tratamento com artemisinina estão ilustrados no gráfico 7. Embora os grupos que receberam as doses de 35 e 70 mg/kg mostrassem uma tendência à redução nos níveis de progestágenos plasmático após o período de tratamento quando comparada com o controle esta diferença não foi estatisticamente significativa. Já os níveis plasmáticos de testosterona materna após tratamento com artemisinina (gráfico 8) foram significativamente diferentes do controle, fêmeas tratadas com 7 mg/kg sofreram um aumento nos níveis de testosterona, enquanto fêmeas tratadas com 35 e 70 mg/kg tiveram uma redução.

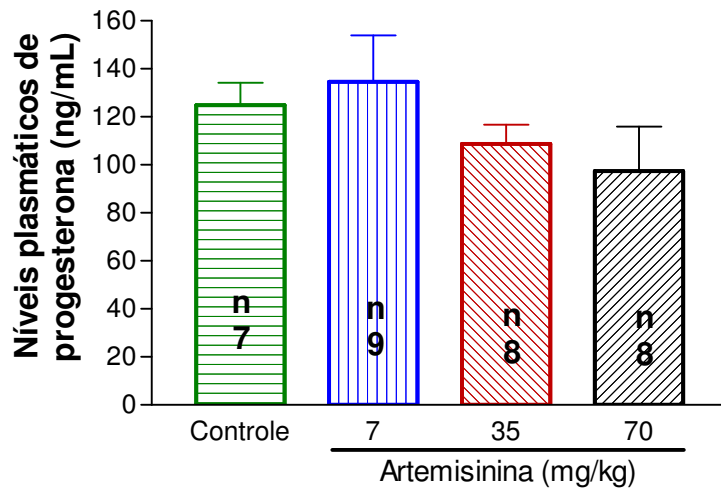


Gráfico 7: Níveis plasmáticos de progestágenos no 14^o dia de prenhez em ratas expostas à artemisinina nos dias 7 a 13 de prenhez

NOTAS: n = número de animais por grupo. Os resultados expressão média \pm erro padrão.

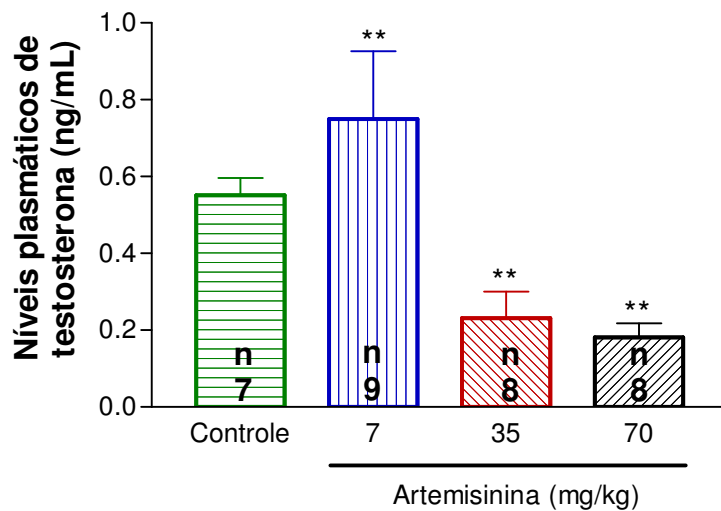


Gráfico 8: Níveis plasmáticos de testosterona no 14^o dia de prenhez em ratas expostas à artemisinina nos dias 7 a 13 de prenhez

NOTAS: n = número de animais por grupo. Os resultados expressão média \pm erro padrão. ** Significativamente diferente do grupo que recebeu apenas veículo ($p < 0,01$) – ANOVA seguido do teste de Tukey.

5.2 TOXICOLOGIA REPRODUTIVA DA ARTEMISININA NO PERÍODO PÓS-IMPLANTE (PERÍODO FETAL) – EXPERIMENTO 2

A administração de artemisinina não interferiu no ganho de massa corporal durante a prenhez entre as fêmeas do grupo controle e as que receberam 7 mg/kg/dia de artemisinina, no entanto houve alteração significativa entre as fêmeas do grupo controle e as tratadas com 35 e 70 mg/kg/dia de artemisinina (gráficos 9 e 10), que apresentaram redução de massa corporal.

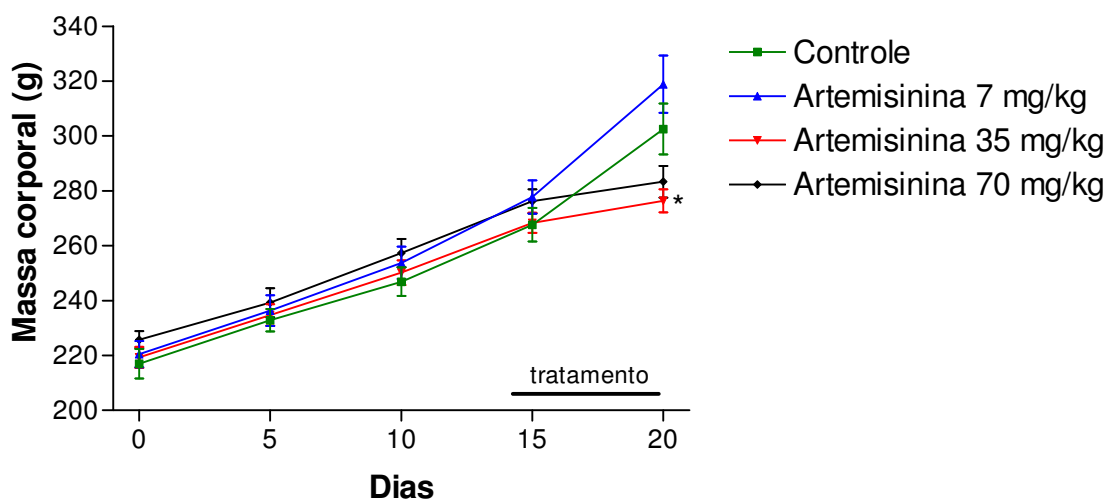


Gráfico 9: Massa corporal durante a prenhez de ratas expostas à artemisinina nos dias 14 a 20 de prenhez

NOTAS: Os resultados expressam média \pm erro padrão. Controle: 8 animais. ART 7: 8 animais. ART 35: 12 animais. ART 70: 9 animais. * Significativamente diferente do grupo que recebeu apenas veículo ($p < 0,05$) – ANOVA seguido do teste de Tukey.

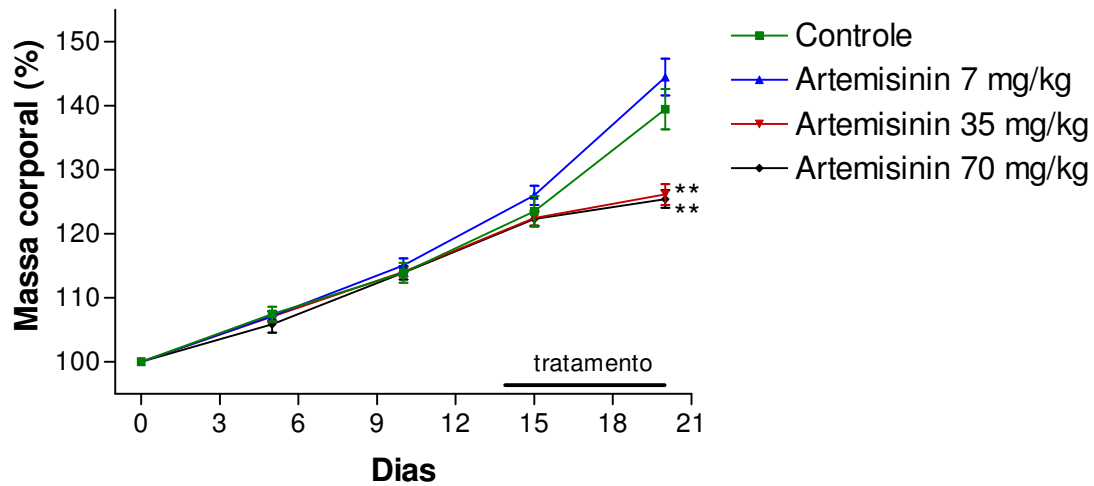


Gráfico 10: Ganho de massa corporal durante a prenhez de ratas expostas à artemisinina nos dias 14 a 20 de prenhez

NOTAS: Os resultados expressam média \pm erro padrão. Controle: 8 animais. ART 7: 8 animais. ART 35: 12 animais. ART 70: 9 animais. ** Significativamente diferente do grupo que recebeu apenas veículo ($p < 0,01$) – ANOVA seguido do teste de Tukey.

Não houve diferença no número de implantes entre os grupos tratados com artemisinina e o grupo controle (tabela 2). A administração de artemisinina na dose de 7 mg/kg/dia não interferiu no tamanho das ninhadas (tabela 2), índices de perda pós-implante (gráfico 11), nascimento (gráfico 12), viabilidade (gráfico 13), desmame (gráfico 14) e parto (gráfico 15). No entanto nos grupos tratados com 35 e 70 mg/kg/dia houve diferença significativa com relação ao grupo tratado com controle veículo em todos esses parâmetros.

Tabela 2 – Dados da prenhez de ratas expostas à artemisinina nos dias 14 a 20 de prenhez

VARIÁVEIS	CONTROLE	ARTEMISININA (mg/kg)		
		7	35	70
Fêmeas com evidência de prenhez	15	15	15	15
Fêmeas prenhas	8	8	12	9
Fêmeas que pariram	8	8	3	0
Tamanho das ninhadas	8,00 ± 1,25	10,3 ± 1,32	1,17 ± 1,00 *	0,0 **
Número de implantes	9,12 ± 1,14	10,5 ± 1,17	10,2 ± 1,01	11,2 ± 0,86

NOTAS: Os resultados expressam média ± erro padrão.

* Significativamente diferente do grupo que recebeu apenas veículo (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) – ANOVA seguido do teste de Tukey.

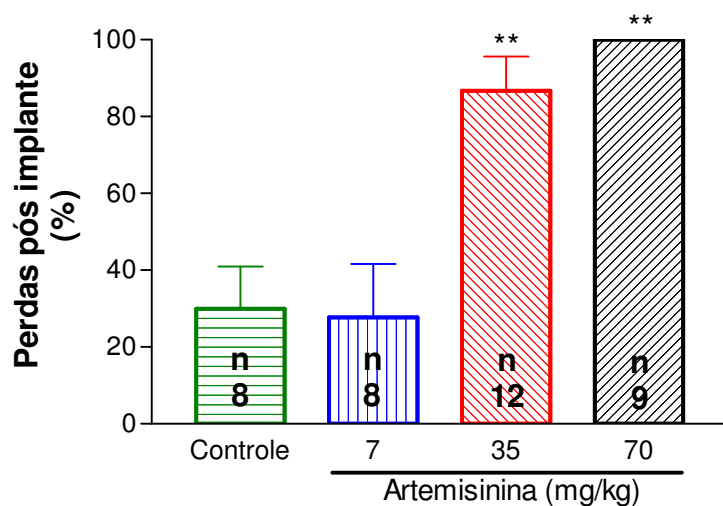


Gráfico 11: Perdas pós-implante em ratas expostas à artemisinina nos dias 14 a 20 de prenhez

NOTAS: n = número de animais por grupo. Os resultados expressam média ± erro padrão.

** Significativamente diferente do grupo que recebeu apenas veículo ($p < 0,01$) – ANOVA seguido do teste de Tukey.

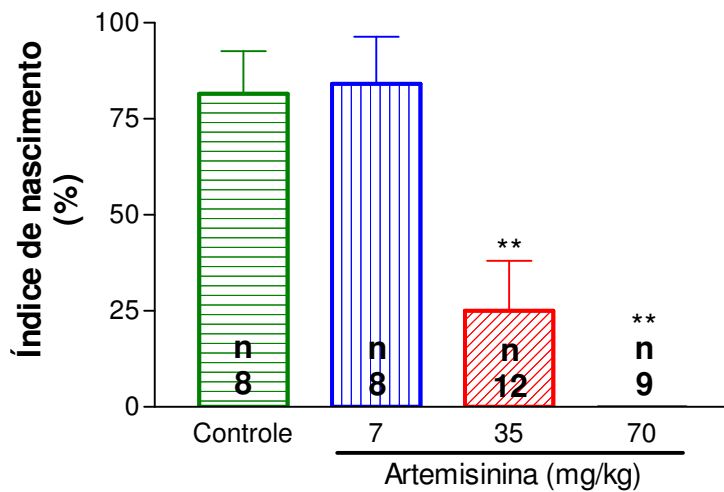


Gráfico 12: Índice de nascimento em progenitoras expostas à artemisinina nos dias 14 a 20 de prenhez

NOTAS: n = número de animais por grupo. Os resultados expressam média \pm erro padrão.

** Significativamente diferente do grupo que recebeu apenas veículo ($p < 0,01$) – ANOVA seguido do teste de Tukey.

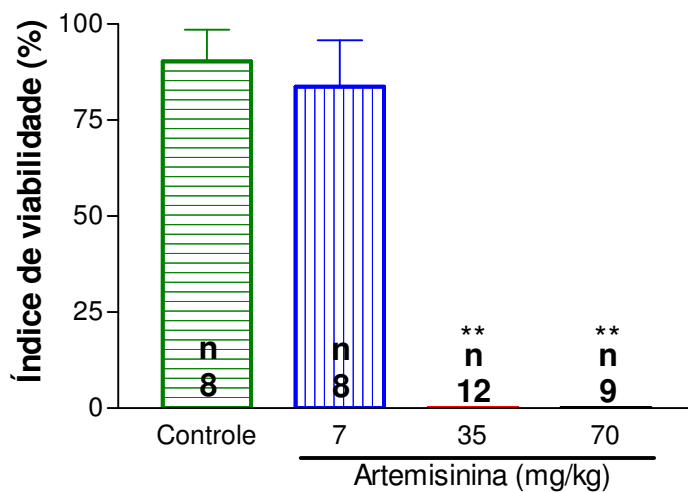


Gráfico 13: Índice de viabilidade de descendentes de progenitoras expostas à artemisinina nos dias 14 a 20 de prenhez

NOTAS: n = número de animais por grupo. Os resultados expressam média \pm erro padrão. ** Significativamente diferente do grupo que recebeu apenas veículo ($p < 0,01$) – ANOVA seguido do teste de Tukey.

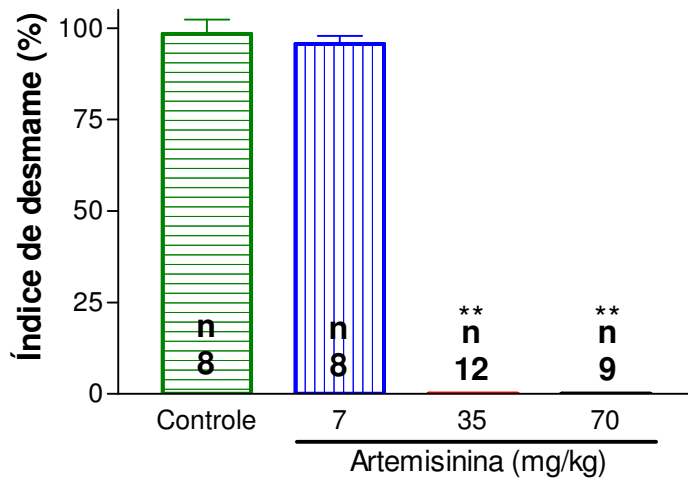


Gráfico 14: Índice de desmame de descendentes de progenitoras expostas à artemisinina nos dias 14 a 20 de prenhez

NOTAS: n = número de animais por grupo. Os resultados expressam média \pm erro padrão. ** Significativamente diferente do grupo que recebeu apenas veículo ($p < 0,01$) – ANOVA seguido do teste de Tukey.

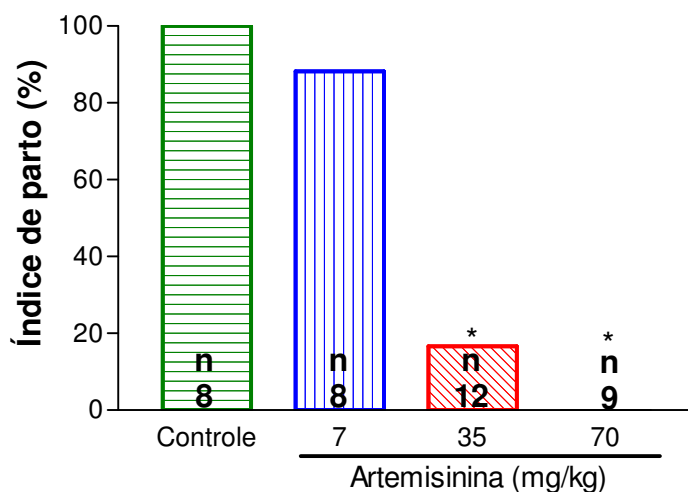


Gráfico 15: Índice de parto de progenitoras expostas à artemisinina nos dias 14 a 20 de prenhez

NOTAS: n = número de animais por grupo. * Significativamente diferente do grupo que recebeu apenas veículo ($p < 0,05$) – qui-quadrado

Nenhuma rata do grupo tratado com 70 mg/kg/dia de artemisinina pariu, todos os filhotes foram reabsorvidos. Duas ratas do grupo ART 35 (35 mg/kg/dia de artemisinina) pariram, mas os filhotes não sobreviveram. Os dados da lactação e desenvolvimento geral dos descendentes machos e fêmeas foram avaliados somente nos grupos controle e tratado com 7 mg/kg/dia de artemisinina.

A massa corporal, ao nascer e ao desmame, não diferiu entre os descendentes expostos ao controle veículo e a artemisinina na dose de 7 mg/kg/dia. O desenvolvimento ponderal dos filhotes durante a lactação também não foi alterado (gráfico 16), bem como os parâmetros para avaliação de desenvolvimento geral da prole: período (dias) para descolamento bilateral das orelhas (gráfico 17), crescimento dos pêlos (gráfico 18) e abertura bilateral dos olhos (gráfico 19).

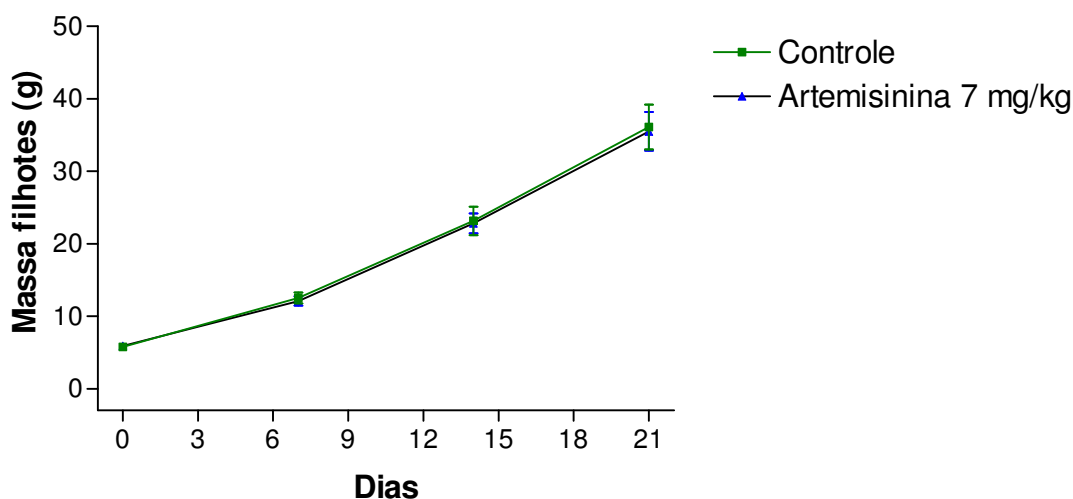


Gráfico 16: Desenvolvimento ponderal no período da lactação de descendentes expostos à artemisinina no período fetal

NOTAS: Controle: 46 animais. ART 7: 72 animais. Os resultados expressam média \pm desvio padrão.

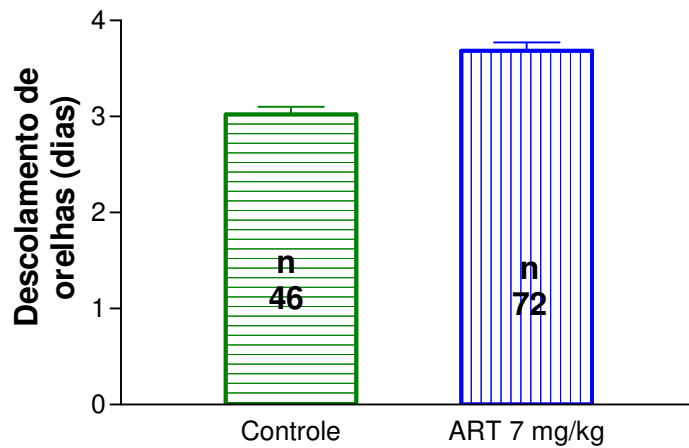


Gráfico 17: Descolamento de orelhas em descendentes expostos à artemisinina no período fetal

NOTAS: n = número de animais por grupo. ART = artemisinina. Os resultados expressam média \pm desvio padrão.

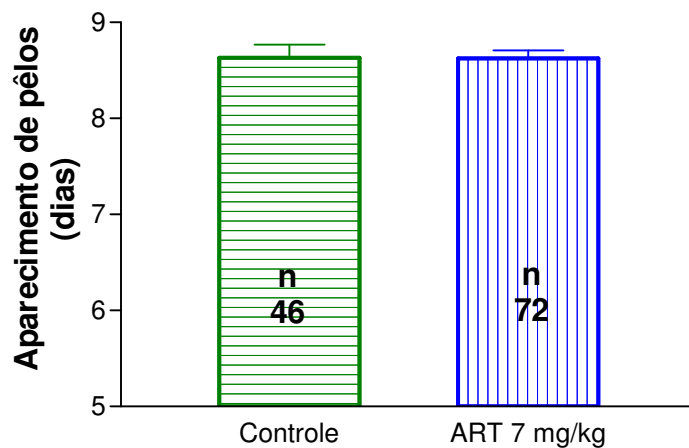


Gráfico 18: Aparecimento de pêlos em descendentes expostos à artemisinina no período fetal

NOTAS: n = número de animais por grupo. ART = artemisinina. Os resultados expressam média \pm desvio padrão.

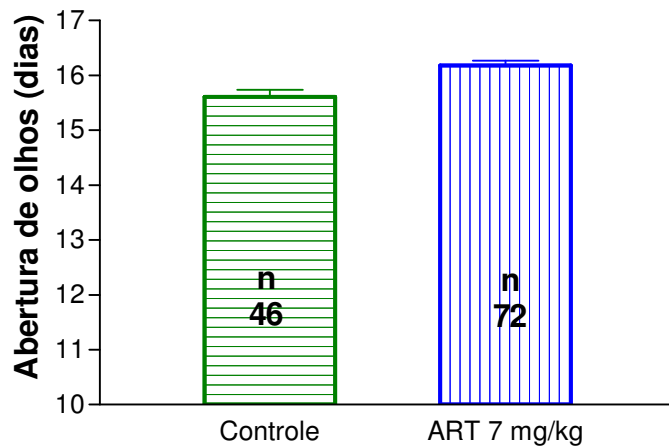


Gráfico 19: Abertura bilateral dos olhos em descendentes expostos à artemisinina no período fetal

NOTAS: n = número de animais por grupo. ART = artemisinina. Os resultados expressam média \pm desvio padrão.

Foram observadas alterações estruturais em uma filhote fêmea exposta a 7 mg/kg de artemisinina. Ela apresentou massa corporal menor que as irmãs, pêlos eriçados, alterações estruturais nas patas e dentes e atraso na abertura do canal vaginal (figura 16).

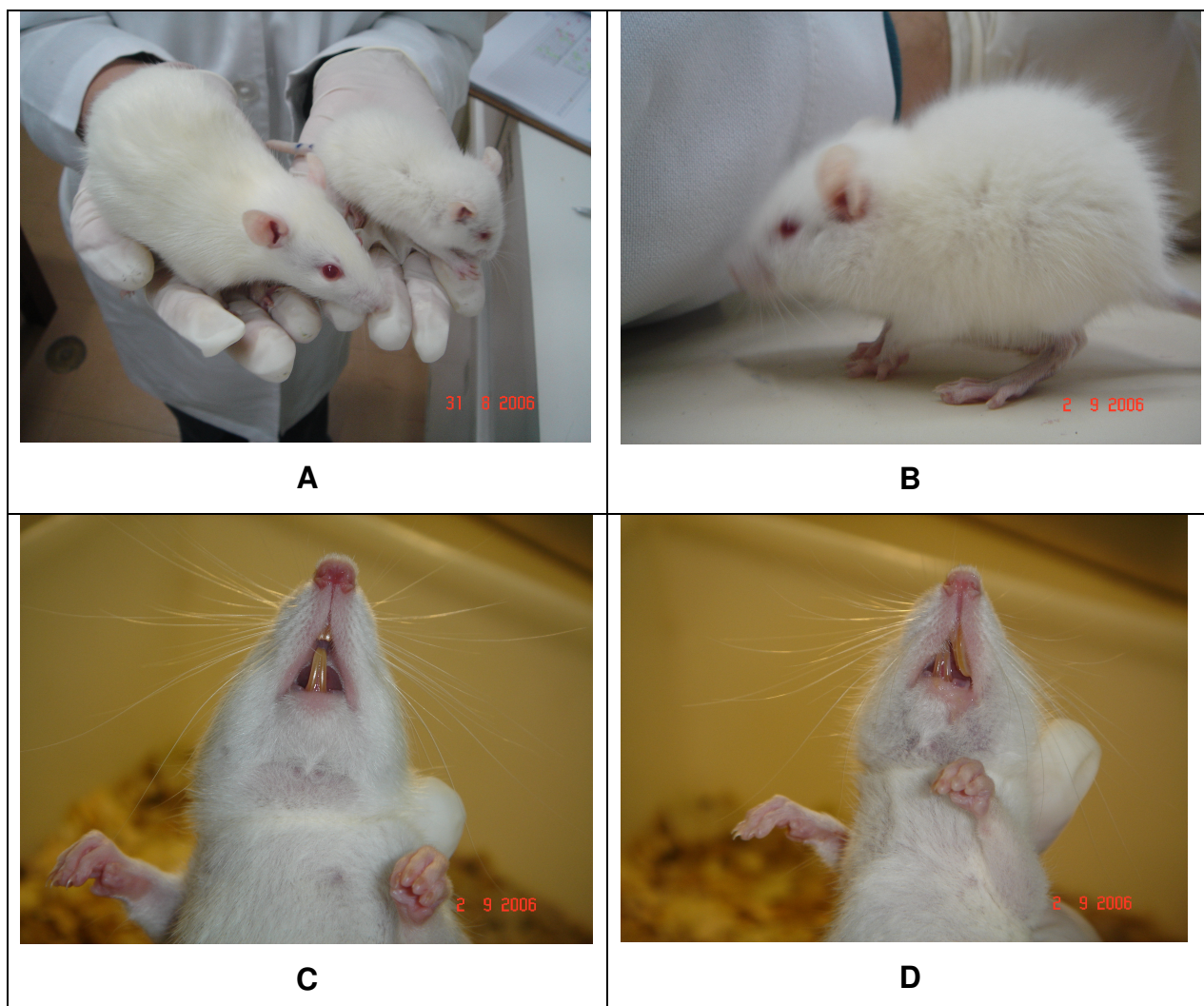


Figura 16: Alterações estruturais em filhote exposto à de artemisinina no período fetal

NOTAS: A: diferença no tamanho em comparação com sua irmã. B: alterações nas patas e piloereção. C: dente normal. D: dente com alteração estrutural.

A exposição à artemisinina nos dias 14 a 20 de prenhez com 7 mg/kg não afetou o tempo de desenvolvimento dos marcadores sexuais analisados, descida dos testículos e separação prepucial (gráficos 20 e 21, respectivamente), nos descendentes machos quando comparado ao grupo controle.

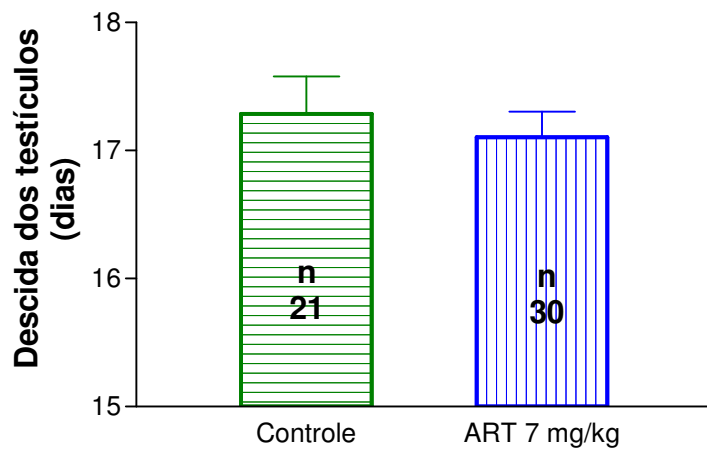


Gráfico 20: Descida bilateral dos testículos em descendentes machos expostos à artemisinina no período fetal

NOTAS: n = número de animais por grupo. ART = artemisinina. Os resultados expressam média \pm desvio padrão.

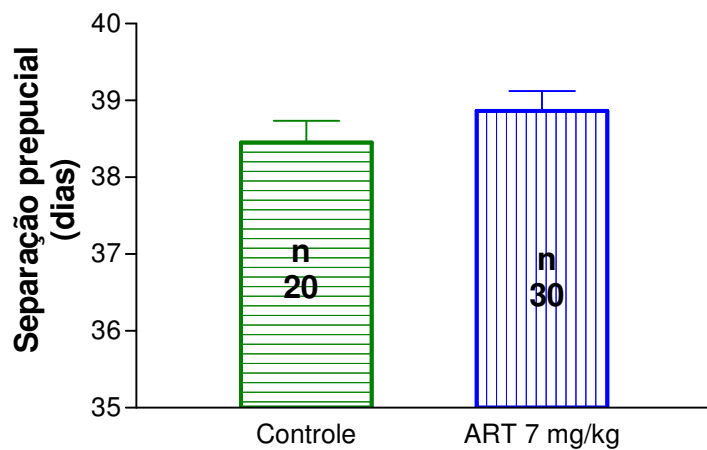


Gráfico 21: Separação prepucial completa em descendentes machos expostos à artemisinina no período fetal

NOTAS: n = número de animais por grupo. ART = artemisinina. Os resultados expressam média \pm desvio padrão.

A produção espermática diária mostrou um decréscimo no grupo exposto à artemisinina, essa diferença não foi estatisticamente significativa, no entanto, o número de espermatozóides na cauda do epidídimo foi estatisticamente reduzido no grupo exposto à artemisinina quando comparado ao grupo de animais controle, enquanto na dosagem dos níveis plasmáticos de testosterona não houve diferença significativa entre o grupo controle e o tratado com 7 mg/kg de artemisinina (tabela 3). O peso dos órgãos (testículos, epidídimos, próstata, vesícula seminal, fígado, rins e adrenais) não diferiu do grupo controle (tabela 4).

Tabela 3 – Variáveis reprodutivas em descendentes machos expostos à artemisinina no período fetal

VARIÁVEIS	CONTROLE	ARTEMISININA 7 mg/kg
Número de progenitoras	6	7
Número de descendentes	15	21
Produção espermática diária (x 10 ⁶ /testículo/dia)	87,5 ± 5,36	73,0 ± 4,83
Produção espermática diária (x 10 ⁶ /g de testículo/dia)	25,9 ± 2,00	21,9 ± 1,5
Número de espermatozóides (x 10 ⁶)	809 ± 27,5	693 ± 31,4 *
Espermatozóides normais (%)	89,8 ± 1,62	82,4 ± 2,53 *
Testosterona (ng/mL)	1,13 ± 0,18	1,41 ± 0,23

NOTAS: Os filhotes foram usados como unidade estatística. Os resultados expressam a média ± erro padrão.

* Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$) – Mann-Whitney.

Tabela 4 – Massa absoluta e relativa de órgãos de descendentes machos expostos à artemisinina no período fetal

VARIÁVEIS	CONTROLE	ARTEMISININA 7 mg/kg
Número de progenitoras	6	7
Número de descendentes	15	21
Massa corporal (g)	350 ± 9,67	345 ± 7,80
MASSA ABSOLUTA		
Fígado (g)	12,4 ± 0,47	12,3 ± 0,41
Rins (g)	1,16 ± 0,04	1,14 ± 0,04
Adrenais (mg)	26,1 ± 1,41	26,3 ± 0,99
Testículos (g)	1,71 ± 0,04	1,68 ± 0,02
Epidídimos (mg)	501 ± 12,6	492 ± 7,37
Próstata (mg)	296 ± 18,3	335 ± 13,3
Vesícula seminal (mg)	740 ± 29,3	732 ± 15,0
MASSA RELATIVA		
Fígado (%)	3,52 ± 0,06	3,56 ± 0,07
Rins (%)	0,331 ± 0,004	0,332 ± 0,008
Adrenais (%)	0,007 ± 0,0003	0,008 ± 0,0002
Testículos (%)	0,49 ± 0,001	0,49 ± 0,001
Epidídimos (%)	0,14 ± 0,003	0,15 ± 0,002
Próstata (%)	0,084 ± 0,004	0,097 ± 0,002 *
Vesícula seminal (%)	0,21 ± 0,006	0,21 ± 0,004

NOTAS: Os filhotes foram usados como unidade estatística. Os resultados expressam a média ± erro padrão. * Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$) – Mann-Whitney.

A exposição à artemisinina nos dias 14 a 20 de prenhez com 7 mg/kg não afetou o tempo de desenvolvimento sexual das descendentes fêmeas (tabela 5), bem como não afetou a massa relativa dos órgãos (tabela 6).

Tabela 5 – Variáveis reprodutivas de descendentes fêmeas expostas à artemisinina no período fetal

VARIÁVEIS	CONTROLE	ARTEMISININA 7 mg/kg
Número de progenitoras	7	7
Número de descendentes	25	41
Abertura do canal vaginal (dias)	41,1 ± 0,57	41,1 ± 0,40
Primeiro estro (dias)	44,6 ± 0,83	45,4 ± 0,52
Primeiro estro a partir da abertura do canal vaginal (dias)	3,52 ± 0,46	4,24 ± 0,31
Intervalo entre estros (dias)	4,53 ± 0,16	4,51 ± 0,10
Descendentes com ciclo regular (%)	64	70

NOTAS: Os animais foram sacrificados no quinto estro. Os descendentes foram usados como unidade estatística. Os resultados expressam a média ± erro padrão.

Tabela 6 – Massa absoluta e relativa de órgãos de descendentes fêmeas expostas à artemisinina no período fetal

VARIÁVEIS	CONTROLE	ARTEMISININA 7 mg/kg
Número de progenitoras	7	7
Número de descendentes	25	39
Massa corporal (g)	179 ± 3,82	184 ± 2,53
MASSA ABSOLUTA		
Fígado (g)	7,86 ± 0,24	8,30 ± 0,15
Rins (mg)	696 ± 16,1	725 ± 15,7
Adrenais (mg)	26,4 ± 1,26	27,5 ± 0,80
Ovários (mg)	41,8 ± 1,36	44,5 ± 1,14
Útero (mg)	386 ± 13,6	387 ± 10,7
MASSA RELATIVA		
Fígado (%)	4,39 ± 0,07	4,51 ± 0,05
Rins (%)	0,390 ± 0,0055	0,393 ± 0,0061
Adrenais (%)	0,015 ± 0,0005	0,015 ± 0,0003
Ovários (%)	0,023 ± 0,0007	0,024 ± 0,0006
Útero (%)	0,22 ± 0,007	0,21 ± 0,006

NOTAS: Os animais foram sacrificados no quinto estro. Os filhotes foram usados como unidade estatística. Os resultados expressam a média ± erro padrão.

6 DISCUSSÃO

Derivados da artemisinina, em monoterapia ou em associações com outros antimaláricos, representam um tratamento relativamente novo e altamente eficaz no tratamento da malária. No Brasil a artemisinina e derivados ainda não são utilizados rotineiramente no tratamento da malária e os medicamentos são importados de outros países, elevando seu custo. O Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Biológicas, Químicas e Agrícolas (CPBQA) da Universidade de Campinas (UNICAMP) adaptou o plantio da *Artemisia annua* no Brasil e padronizou o isolamento da artemisinina no ano de 2006 (RODRIGUES *et al.*, 2006). O lançamento de derivados da artemisinina está previsto para 2007 através do laboratório Laborgen®.

Tratamento de malária com artemisinina e derivados não é recomendado na gestação, principalmente no primeiro trimestre, devido à escassez de dados sobre a segurança em humanos e estudos que demonstram toxicidade reprodutiva em animais, mas devido à disseminação de *P. falciparum* resistente à maioria dos antimaláricos, muitas vezes é necessário o tratamento com esses fármacos (WHO, 2003). No Brasil ainda não estão comprovados casos de *Plasmodium* multi-drogas resistentes, mas com a alta incidência destes na África, a globalização e a presença de grande número de vetores no Brasil não podemos excluir a possibilidade do surgimento de resistência. Uma análise retrospectiva realizada por Suárez-Mutis e Coura (2007) na área rural do médio Rio Negro, na Amazônia brasileira, demonstrou uma mudança no padrão epidemiológico da malária, que inicialmente atingia mais homens adultos, e agora afeta em maior proporção as crianças, com um expressivo aumento de casos entre as mulheres, aumentando a necessidade de testes que

comprovem a segurança do tratamento com derivados da artemisinina durante a gestação.

Devido à dificuldade na obtenção de dados em humanos durante a gestação, podem ser desenvolvidos experimentos em animais para determinação de distúrbios reprodutivos devido ao tratamento com artemisinina. Em geral, os efeitos adversos observados em animais de laboratório, quando expostos a um agente tóxico, podem ocorrer em humanos (LU, 1991; DOURSON, 2002). Roedores e coelhos são os animais mais adequados para os estudos de toxicologia reprodutiva. A facilidade de criação e manutenção e o curto período de gestação favorecem o uso destes animais. Os ratos são usados preferencialmente, por apresentarem tamanho adequado e processos reprodutivos bem estabelecidos (AMANN, 1982; ZENICK e CLEGG, 1989), e apesar de possuir diferenças no metabolismo em relação aos humanos, a artemisinina ativa o receptor CAR da mesma forma que em humanos e, em menor intensidade, o receptor PXR, justificando a escolha do rato como animal experimental.

Muitas vezes os sinais de toxicidade ajudam a elucidar o mecanismo de ação da substância, apontando o órgão alvo e o efeito específico, mas apesar da similaridade entre seres humanos e animais em muitos aspectos, os efeitos adversos induzidos pelos agentes químicos estão relacionados com as características pertinentes a cada indivíduo, devendo-se então respeitar as diferenças e considerar a maior sensibilidade do ser humano em relação a outros mamíferos (DOURSON, 2002).

O mecanismo da ação tóxica da artemisinina na gravidez não é conhecido, apesar de terem sido encontradas diversas alterações em estudos com animais. A interação da artemisinina com receptores responsáveis pela

metabolização de hormônios esteróides pode alterar os níveis plasmáticos desses hormônios e existe a possibilidade de que a toxicidade reprodutiva seja devido a essas alterações. Esses receptores estão presentes tanto em ratos como em humanos.

O intuito de comprovar os distúrbios observados sobre os embriões durante o tratamento com a artemisinina e de elucidar o mecanismo de ação da sua toxicidade reprodutiva, que poderiam ser extrapolados para humanos, motivaram o desenvolvimento desse trabalho.

6.1 TOXICOLOGIA REPRODUTIVA DA ARTEMISININA NO PERÍODO PÓS-IMPLANTE (ORGANOGENESE) – EXPERIMENTO 1

6.1.1 Toxicidade materna

Para avaliar a ação do medicamento sobre a progenitora, a mortalidade é um sinal claro de toxicidade, no entanto, outras variáveis podem ser indicativas de efeitos adversos mais sutis, como perda de massa corporal durante o tratamento, massa dos órgãos, dados da prenhez e sinais clínicos de toxicidade (diarréia, piloereção, sangramento, variações no comportamento...). Alterações nos níveis plasmáticos hormonais nas progenitoras podem não levar a sinais de toxicidade materna, mas podem induzir toxicidade reprodutiva na prole. O tamanho da ninhada é influenciado pelo número de ovócitos viáveis para fertilização, pelas taxas de fertilização e implantação e pela proporção de embriões implantados que sobrevivem até o parto. Um agente químico pode interferir no desenvolvimento dos

embriões diretamente, ou indiretamente, ao comprometer a capacidade da progenitora em sustentar a prole (EPA, 1991; EPA, 1996).

Com a administração de artemisinina nas doses de 35 e 70 mg/kg houve uma redução do ganho de massa das progenitoras a partir do início do tratamento, no dia 7 de prenhez, mas o resultado não apresentou significância estatística. Não houve alteração nas massas absolutas e relativas dos órgãos das progenitoras tratadas com artemisinina em nenhuma das doses administradas em relação ao controle, nem sinais clínicos de toxicidade, indicando ausência de toxicidade materna nas doses testadas.

6.1.2 Dados da prenhez

O número de implantes uterinos entre as progenitoras tratadas com diferentes doses de artemisinina e o grupo controle não diferiu significativamente, o tratamento foi realizado a partir do sétimo dia de prenhez, evitando qualquer efeito sobre a implantação do ovo no útero (perda pré-implante), que em ratos acontece cinco a seis dias após a fecundação (BERNARDI *et al.*, 2002). No entanto houve alteração significativa com relação ao número de embriões viáveis no final do tratamento. Houve reabsorção de todos os embriões das progenitoras tratadas com as doses de 35 e 70 mg/kg de artemisinina, doses relativamente baixas, considerando-se que a dose utilizada em humanos é de 7 mg/kg e que a DL (dose letal) da artemisinina é > 5000 mg/kg. Na dose de 7 mg/kg de artemisinina o percentual de reabsorções não foi estatisticamente significante em relação ao grupo controle.

6.1.3 Dosagens plasmáticas de progestágenos e testosterona

Os dados desse estudo indicam que a administração de artemisinina não resultou em alterações significativas nos níveis de progestágenos plasmáticos, embora nos grupos tratados com 35 e 70 mg/kg houvesse uma tendência à redução nesses níveis, após o tratamento, em relação ao grupo controle. Os resultados podem não ter diferido significativamente porque os anticorpos utilizados para a dosagem dos níveis plasmáticos de progesterona não reagem somente com esta, mas com vários de seus metabólitos. Os níveis plasmáticos de testosterona após o tratamento com artemisinina foram significativamente diferentes do controle, comprovando que o balanço hormonal foi alterado pela administração com artemisinina.

As alterações endócrinas que acompanham a gravidez são extremamente importantes na fisiologia e fisiopatologia em mamíferos (MASUYAMA *et al.*, 2001). Os receptores nucleares PXR (*Pregnane Xenobiotic Receptor*) e CAR (*Constitutive Androstane Receptor*) estão relacionados com biossíntese, distribuição, metabolismo e eliminação de hormônios esteróides, e têm um papel importante na desregulação endócrina (KLIEWER *et al.*, 2002; MIKAMO *et al.*, 2003; YOU, 2004). Alterações no equilíbrio hormonal em períodos críticos de desenvolvimento podem causar sérios problemas no embrião (KRETSCHMER e BALDWIN, 2005).

Artemisinina e seus derivados ativam os receptores nucleares PXR e CAR e induzem as enzimas do citocromo P450 CYP2B6, CYP2C19 e CYP3A4 (BURK *et al.*, 2005), responsáveis pelo metabolismo de hormônios esteróides e podem alterar suas funções fisiológicas (KRETSCHMER e BALDWIN, 2005).

A progesterona é um hormônio importante para a manutenção da gestação. Aumento dos níveis plasmáticos de progesterona na gravidez é crítico para o desenvolvimento uterino, implantação do embrião, proteção contra rejeição tecidual e manutenção da gestação (VITZTHUM *et al.*, 2006). A progesterona é um dos principais agentes responsáveis pelo relaxamento uterino na gestação, visto que estudos indicam que a redução da progesterona é responsável pelo início do parto (MOHAN e BINNETT, 2006). Pesquisas em ratos, camundongos e macacos têm demonstrado que antagonistas da progesterona afetam diretamente o embrião, levando a falha na implantação e atraso na transição de mórula a blástula (SPITZ *et al.*, 2000), e que existe uma relação quantitativa entre níveis de progesterona e a manutenção da gestação (CSAPO e WIEST, 1969⁶ *apud* MILLER *et al.*, 2004). Baird (2000) cita a relação dos antagonistas da progesterona com sangramento e abortos e Druckmann e Druckmann (2005), a importância da progesterona inibindo o sistema imune para impedir a rejeição do feto.

Desta maneira, perdas embrionárias observadas neste estudo podem ter sido causadas pelo desequilíbrio hormonal induzido pela artemisinina. Não foi possível determinar os níveis plasmáticos específicos de progesterona, e sim de vários progestogênios, mas os dados indicam uma possível redução neste hormônio.

Outra explicação para as alterações hormonais observadas é que estas podem ter sido causadas pelas perdas embrionárias e não ser consequência dessas, sendo necessária a realização de mais experimentos para elucidar essa hipótese.

⁶ CSAPO, I; WIEST, WG. An examination of the quantitative relationships between progesterone and the maintenance of pregnancy. **Endocrinology**, v. 85, p. 735-746, 1969.

6.2 TOXICOLOGIA REPRODUTIVA DA ARTEMISININA NO PERÍODO PÓS-IMPLANTE (PERÍODO FETAL) – EXPERIMENTO 2

6.2.1 Toxicidade materna

A administração de artemisinina afetou significativamente a massa das progenitoras dos grupos tratados com as doses de 35 e 70 mg/kg, e não afetou nas tratadas com 7 mg/kg, em relação ao controle. Esse dado não indica necessariamente toxicidade materna, pois nenhum outro sinal clínico foi observado. A provável explicação para esta perda de peso é o fato de que houve alta incidência de reabsorção dos embriões das mães tratadas, fazendo com que o peso destas ratas fosse reduzido. Esta redução no ganho de massa das ratas tratadas iniciou juntamente com o tratamento com artemisinina. A partir do início do tratamento foram observados sangramento nas caixas e na parte ventral da cauda de ratas tratadas, indicando que provavelmente o tratamento estava provocando efeitos adversos a gestação.

6.2.2 Dados da prenhez e lactação

As perdas pós-implante não diferiram entre o grupo controle e o tratado com 7 mg/kg de artemisinina, assim como os índices de nascimento, viabilidade, desmame e parto. No entanto, houve diferença significativa entre os grupos tratados com 35 e 70 mg/kg de artemisinina e o grupo controle em todos esses parâmetros.

A perda pós-implante foi de 87% no grupo tratado com 35 mg/kg e de 100% no grupo tratado com 70 mg/kg de artemisinina, indicando que o medicamento é

altamente abortivo em ratos Wistar nessas doses e neste período. No experimento 1 (período de organogênese) dessa pesquisa houve também alto índice de reabsorções, confirmando a grande toxicidade reprodutiva da artemisinina em ratos.

Pesquisas anteriores utilizando artemisinina e seus derivados semi-sintéticos já demonstravam letalidade embrionária em animais de laboratório, mesmo em pequenas doses ou poucos dias de tratamento, principalmente no início da gestação (WHO, 2003).

Estudos de toxicologia reprodutiva foram realizados na China (1982) pelo *China Cooperative Research Group on Qinghaosu and Its Derivatives as Antimalarials*⁷ utilizando artemisinina em ratos. Quando o tratamento foi realizado nos seis primeiros dias de prenhez, período pré-implantação, a gestação desenvolveu-se normalmente. Na administração feita nos dias 6 a 15 de prenhez, com as doses⁸ de 50 e 200 mg/kg houve reabsorção de 100% dos embriões, na dose⁹ de 12,5 mg/kg houve 50% de reabsorção. Na dose⁹ de 200 mg/kg nos dias seis a oito de prenhez foi observada hérnia umbilical em 6,1% dos ratos (*apud* LONGO *et al.*, 2006a).

Estudos sobre a toxicologia reprodutiva do artemeter – derivado semi-sintético lipossolúvel da artemisinina – foram realizados por Chen *et al.* (1984)⁹, em camundongos, ratos e coelhos. A NOAEL (*no observed adverse effect level* – maior dose onde não se observam efeitos tóxicos) foi 5,4 mg/kg em camundongos, 2,7 mg/kg em ratos e 0,7 mg/kg em coelhos. Foi observado 100% de reabsorção na dose de 21,4 mg/kg/dia em camundongos (tratados do 6º ao 15º dias de prenhez),

⁷ CHINA COOPERATIVE RESEARCH GROUP ON QINGHAOSU AND ITS DERIVATIVES AS ANTIMALARIALS. **J. Traditional Chin. Med.**, v. 2, n. 1, p. 31-38, 1982.

⁸ Doses baseadas na DL₅₀ da artemisinina em ratos de 5000 mg/kg.

⁹ CHEN, L. J. *et al.* Embriotoxicity and teratogenicity studies on artemether in mice, rats and rabbits. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 5, n. 2, p. 118-122, 1984.

mais de 90% de reabsorção na dose de 10,7 mg/kg/dia em ratos (tratados do 6º ao 15º dias de prenhez) e na dose de 2,7 mg/kg/dia em coelhos (tratados do 7º ao 18º dias de prenhez) (CHEN *et al.*, 1984 *apud* CLARK *et al.*, 2004; LONGO *et al.*, 2006a).

No mesmo trabalho Chen *et al.* (1984) trataram camundongos com 21,4 mg/kg de artemeter durante diferentes períodos da prenhez, do 1º ao 5º, do 9º ao 11º, do 12º ao 14º e do 15º ao 17º dias de prenhez. Ocorreu reabsorção no período do 9º ao 11º, e nos outros períodos não foram observados efeitos de toxicidade reprodutiva (CHEN *et al.*, 1984 *apud* CLARK *et al.*, 2004; LONGO *et al.*, 2006a).

Li *et al.* (1988)¹⁰, administraram artesunato (derivado semi-sintético hidrossolúvel da artemisinina) nas doses de 0,41; 0,54; 0,81; 3,25 e 26 mg/kg/dia em ratos nos dias 6 a 15 de prenhez e observaram reabsorção dose-dependente (5,8; 32,8; 98; 100 e 100% respectivamente). Li *et al.* também expuseram ratas prenhas à 26 mg/kg de artesunato no início da gestação, do dia 1 ao dia 6 de prenhez, 82,3% dos fetos sobreviveram, já no tratamento após o 8º dia de prenhez houve 100% de reabsorção. Quando a mesma dose foi administrada nos dia 6 a 8 de prenhez apenas 17,1% dos fetos sobreviveram (LI *et al.*, 1988 *apud* LONGO *et al.*, 2006a).

Xu e Zhang (1996)¹¹, demonstraram que a LOEL dose (LOEL – *lowest observed effect level* – menor dose onde se observam efeitos adversos – 20 mg/kg) da dihidroartemisinina (derivado semi-sintético da artemisinina) induz reabsorção quando administrada no sétimo dia de prenhez em camundongos. Também foram relatados abortos após administração de dihidroartemisinina e artesunato (NOAEL 4,2 e 10 mg/kg, respectivamente) no dia cinco de prenhez em hamsters, e após administração de dihidroartemisinina (LOEL – 10 mg/kg) no 18º dia de prenhez em

¹⁰ LI, Z. L. *et al.* Studies on teratogenicity of sodium artesunate. **Zongyao Tong Bao** (Bull. Chin. Mater Med.), v. 13, n. 4, p. 42-44 e 63-64, 1988.

¹¹ XU, J. H., ZHANG, Y. P. [Contraceptational effects of dihydroartemisinin and artesunate] (in Chinese). **Yao Hsueh Pao Acta Pharmacologica Sinica**, v. 31, p. 657-666, 1996.

cobaias e artesunato (LOEL 1 mg/kg/dia) no dias 5 a 8 de prenhez em hamsters (XU e ZHANG, 1996 *apud* CLARK *et al.*, 2004).

Clark tratou ratos com artesunato nas doses de 6, 10, e 16,7 mg/kg/dia nos dias 6 a 17 de prenhez e 5, 7 e 12 mg/kg/dia nos dias 6 a 19 de prenhez em coelhos. Observou aborto em coelhos e reabsorção em ratos e coelhos (CLARK *et al.*, 2004).

Longo *et al.*, em 2006, administraram dihidroartemisinina em cultura de embriões de ratos *in vitro*, 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1 e 2 mcg/mL no dia 9,5 de prenhez, sem morte dos embriões (LONGO *et al.*, 2006a).

Os estudos realizados na China pelo *China Cooperative Research Group on Qinghaosu and Its Derivatives as Antimalarials* (1982), por Chen *et al.* (1984), por Li *et al.* (1988) e por Xu e Zhang *et al.* (1996) só estão disponíveis em chinês, dificultando uma análise mais detalhada da metodologia utilizada e dos resultados obtidos, sendo necessária a utilização de citações desses trabalhos por Clark *et al.* (2004) e Longo *et al.* (2006a). Com exceção dos experimentos realizados pelo *China Cooperative Research Group on Qinghaosu and Its Derivatives as Antimalarials*, que utilizou artemisinina, os outros estudos utilizaram derivados semi-sintéticos como artemeter, artesunato e dihidroartemisinina para realização dos experimentos de toxicologia reprodutiva, esses derivados possuem efeito terapêutico dez vezes maior que a artemisinina, o que dificulta a comparação de doses com o presente estudo.

Os estudos realizados pelo *China Cooperative Research Group on Qinghaosu and Its Derivatives as Antimalarials* no período pós-implantação, nos dias 6 a 15 de prenhez, nas doses de 50 e 200 mg/kg resultou em perdas embrionárias semelhantes às encontradas no presente estudo, nos dias 7 a 13 de prenhez, nas doses de 35 e 70 mg/kg: 100% de perda embrionária. No presente experimento não

ocorreram perdas embrionárias na dose de 7 mg/kg e o estudo do grupo chinês encontrou 50% de perda embrionária na dose de 12,5 mg/kg, indicando que possivelmente o início da toxicidade é induzido entre essas doses.

Efeito comum observado em todos os experimentos foi um aumento de perdas pós-implante dose-dependente, com perda total nas maiores doses, nos tratamentos iniciados após o dia 6 de prenhez, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo.

Os estudos anteriores a este indicam maior sensibilidade nos dias 9 a 14 de prenhez em ratos, com redução dos efeitos quando as drogas foram administradas antes do dia 8 e após o dia 14 de prenhez. No entanto no presente experimento ocorreu perda embrionária ou fetal de maneira semelhante em ambos os períodos tratados: no período da organogênese e no período fetal.

6.2.3 Desenvolvimento geral dos descendentes

Fêmeas tratadas com 35 mg/kg de artemisinina chegaram a parir, mas o índice de viabilidade, filhotes vivos no 4º dia pós-natal em relação ao número de filhotes nascidos vivos, foi de 0%. Os filhotes não mamavam, aparentemente a mãe não tinha leite para amamentar, fator que também pode estar relacionado com baixos níveis de progesterona. A progesterona e a prolactina são fatores relacionados. A prolactina é um fator requerido para manter o corpo lúteo, que produz progesterona em níveis elevados, a alteração da progesterona pode interferir também nos índices de prolactina (LINZER e FISCHER, 1999).

Por haver perda de todos os filhotes dos grupos tratados com 35 e 70 mg/kg de artemisinina, o desenvolvimento geral e sexual dos filhotes foi avaliado somente na prole dos grupos expostos ao controle veículo e 7 mg/kg de artemisinina.

A administração de artemisinina na dose de 7 mg/kg não afetou o desenvolvimento ponderal dos filhotes durante a lactação, nem os parâmetros de desenvolvimento geral observados, descolamento de orelhas, abertura dos olhos e aparecimentos de pêlos.

Anormalidades estruturais podem ser indicativas de toxicidade de desenvolvimento (EPA, 1991). Um dos filhotes fêmea de progenitora tratada com 7 mg/kg de artemisinina nasceu com anormalidades estruturais, possui massa corporal significativamente menor que as irmãs e alterações nas patas e nos dentes.

Nos estudos realizados pelo *China Cooperative Research Group on Qinghaosu and Its Derivatives as Antimalarials* (1982), utilizando artemisinina em ratos não foi observada alteração no desenvolvimento dos ratos que sobreviveram, da mesma maneira nos estudos realizados por Chen *et al.* (1984) com artemeter não foi observada teratogenicidade e os fetos que sobreviveram tiveram desenvolvimento normal em todas as espécies – camundongos, ratos e coelhos (*apud Clark et al.*, 2004; Longo *et al.*, 2006a). No entanto, Li (1988) relatou retardo no desenvolvimento do esqueleto e hérnia umbilical nos filhotes de ratos que sobreviveram ao tratamento com artesunato (*apud Longo et al.*, 2006a). Clark *et al.* (2004) descreveu anormalidades cardiovasculares e alterações no desenvolvimento do esqueleto em ratos e coelhos tratados com artesunato e Longo *et al.* observou anormalidades anatômicas em cultura de embriões e em embriões *in vivo* tratados com dihidroartemisinina (LONGO *et al.*, 2006a; LONGO *et al.*, 2006b).

Não se pode afirmar que as alterações observadas no filhote exposto à artemisinina são devidas ao tratamento, visto que somente um filhote apresentou problemas, mas estudos anterior demonstram que, mesmo em doses baixas, podem ocorrer alterações estruturais em animais expostos à artemisinina durante a gestação.

6.2.4 Desenvolvimento sexual dos descendentes

Entre as variáveis recomendadas para avaliação de interferência endócrina de substâncias química sobre o desenvolvimento sexual estão a descida dos testículos e os biomarcadores de início da puberdade, que, em ratos, são analisados pelos tempos médios (dias) para a separação prepucial e para a abertura do canal vaginal (EPA, 1996). Compostos que desestabilizem o equilíbrio hormonal podem interferir nesses processos, acelerando ou retardando. Entre os hormônios que tem seu metabolismo acelerado com a ativação de receptores PXR e CAR pela artemisinina estão os androgênios e os estrogênios (BURK *et al.*, 2005; KRETSCHMER e BALDWING, 2005), podendo então haver alterações no desenvolvimento sexual de ratos expostos à artemisinina no período pré-natal.

Não houve alterações no desenvolvimento sexual das fêmeas expostas à 7 mg/kg de artemisinina durante a prenhez.

Nos filhotes machos houve redução significativa no número de espermatozoides e uma tendência à redução na produção espermática. No entanto não houve diferença entre os grupos nos níveis plasmáticos de testosterona, separação prepucial e descida dos testículos. Diminuição na produção espermática pode ocorrer sem alterações em outras variáveis reprodutivas, pois estas variáveis

têm origens diferentes. Enquanto a produção espermática depende do correto desenvolvimento e multiplicação das células de Sertoli, variáveis de marcação como descida dos testículos e separação prepucial e níveis hormonais são dependentes das células de Leydig (WILSON *et al.*, 1981). As células de Sertoli sofrem mitose no período perinatal e são responsáveis pela formação e desenvolvimento normal dos túbulos seminíferos, que resultará na produção espermática dos testículos na vida adulta (ORTH *et al.*, 1988).

Em 2003 a WHO publicou um relatório sobre artemisinina e gestação e relatou que existem indicações em alguns experimentos de alteração em contagem espermática, mas estas alterações não foram sistematicamente estudadas, indicando que pode haver relação entre a administração do medicamento na gestação e alterações hormonais que podem levar a uma diminuição na produção espermática. Essas evidências corroboram com os resultados de redução espermática obtidos nesse experimento, e essas alterações podem estar relacionadas com a redução dos níveis plasmáticos de testosterona reduzidos encontrados nas progenitoras tratadas com artemisinina.

Apesar de dados indicando que há decrescente sensibilidade dos efeitos sobre o desenvolvimento ou sobrevivência fetal nos estágios mais avançados da gestação (WHO, 2003), os resultados do presente estudo indicam a mesma toxicidade em ambos os períodos, inicial e tardio, de gestação, utilizando baixas doses de artemisinina. Derivados da artemisinina são fármacos efetivos e indispensáveis no combate à malária, mas a exposição de embriões e fetos de ratos demonstrou perdas pós-implante independente do período de tratamento. Nesse estudo também demonstrou alterações nos níveis plasmáticos hormonais das

progenitoras tratadas, mas sem comprovar a exata relação dessas alterações com as perdas embrionárias e fetais observadas. Mais estudos são necessários para elucidar a toxicidade potencial em todos os períodos de gestação, incluindo a fase de implantação. Também são recomendados mais estudos para definir o mecanismo preciso da toxicologia reprodutiva da artemisinina em modelos animais, incluindo mais pesquisas sobre os efeitos hormonais e ações sobre o desenvolvimento sexual de descendentes machos expostos à artemisinina durante a gestação. A recomendação atual da WHO que os derivados da artemisinina não devem ser utilizados no primeiro trimestre de gestação permanece, mas também são necessários critérios rígidos para sua utilização no segundo e terceiro trimestres de gestação, somente nos casos em que o tratamento é necessário para salvar vidas.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo foi investigada a toxicologia reprodutiva da artemisinina em dois períodos críticos da gestação: organogênese (tratamento do dia 7 a 13 de prenhez) e período fetal (tratamento do dia 14 a 20 de prenhez). Com os dados apurados demonstramos que:

- O tratamento com artemisinina por sete dias consecutivos no período da organogênese induz alterações hormonais em ratas Wistar prenhas.
- A exposição à artemisinina por sete dias consecutivos causa morte embrionária nas doses de 35 e 70 mg/kg, tanto no período da organogênese quanto no período fetal.
- A exposição à artemisinina na dose de 7 mg/kg durante sete dias no período fetal não afetou o desenvolvimento geral e sexual dos filhotes fêmeas.
- A exposição à artemisinina na dose de 7 mg/kg induz alterações na contagem espermática, sem afetar outras variáveis do desenvolvimento geral e sexual dos filhotes machos.

Concluindo, a artemisinina é tóxica para a gestação de ratas Wistar, tanto no período de organogênese quanto no período fetal, e essas alterações podem ser devido à alterações nos níveis plasmáticos hormonais das progenitoras induzidas pela artemisinina.

REFERÊNCIAS

- AGTMAEL, M. A. *et al.* Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 5, p. 199-205, mai. 1999.
- ALIN, M. H. *et al.* Multiple dose pharmacokinetics of oral artemisinin and comparison of its efficacy with that of oral artesunate in falciparum malaria patients. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 61-65, 1990.
- AMANN, R. P. Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. **Fundam Appl Pharmacol**, v. 2, n. 82, p. 13-25, 1982.
- ASHLEY, E. *et al.* Malaria. **Travel Medicine and Infectious Disease**, article in press, jun. 2005.
- ASHTON, M. *et al.* Artemisinin kinetics and dynamics during oral and rectal treatment of uncomplicated malaria. **Clinical Trials and Therapeutics**, v. 63, n. 4, p. 482-493, 1998.
- AVERY, M. A. *et al.* Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinina. 7. Direct modification of (+)-artemisinin *in vivo* antimalarial screening of new, potential preclinical antimalarial candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 4321-4335, abr. 2002.
- BAIRD, D. T. Clinical uses of antiprogestogens. **Journal of Society for Gynecologic Investigation**, v. 7 n. 1 (supplement), jan./fev. 2000.
- BARNES, K. I.; WHITE, N. J. Population biology and antimalarial resistance: the transmission of antimalarial drug resistance in *Plasmodium falciparum*. **Acta Tropica**, v. 94, p. 230-240, 2005.
- BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 691-699.
- BÉRTOLI, M.; MOITINHO, M. L. R. Malária no estado do Paraná, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 1, p. 43-47, jan./fev., 2005 .
- BURK, O. *et al.* Antimalarial artemisinin drugs induce cytochrome P450 and MDR1 expression by activation of xenosensors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 67, p. 1954-1965, mar. 2005.
- BUTLER, D. Time to put malaria control on the global agenda. **Nature**, v. 386, p. 535-536, abr., 1997.

CHAHOU, I.; KWASIGROCH, T. W. Controlled breeding of laboratory animal. Em: NEUBERT, D.; MERKER, H. J.; KWASIGROCH, T. E. (editores), **Methods in Prenatal Toxicology Evaluation of Embryologic Effects in Experimental Animals**. Berlin: Teratology Workshop; p. 78-91, 1977.

CLARK, R. L. *et al.* Developmental toxicity of artesunate and an artesunate combination in the rat and rabbit. **Birth Defects Research (Part B)**, v. 71, p. 380-394, 2004.

DHINGRA, V.; RAO, K. V.; NARASU, M. L. Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. **Life Sciences**, v. 66, n. 4, p. 279-300, ago. 2000.

DOURSON, M.; CHARNLEY, G.; SCHEUPLEIN, R. Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity. II Risk and regulation. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 35, n. 3, p. 448-467, 2002.

DRUCKMANN, R.; DRUCKMANN, M. A. Progesterone and the immunology of pregnancy. **Journal of steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 97, p. 389-396, 2005.

DUTRA, R. A. Malária – Informações para profissionais da saúde. **SUCEN/SP – Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo**, 2001. Disponível em: http://www.sucen.sp.gov/doencas/malaria/texto_malaria.pro.htm. Acesso em: 24 mai. 2007.

EPA – US Environmental Protection Agency. Protocol RTI P. O. Box 12194 research triangle park, NC 27709 RTI-839. Disponível em: <http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/meetings/2002/march/inuterolactationprotocol.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2006.

EPA – US Environmental Protection Agency. Guidelines for developmental toxicity risk assessment. EPA/600/FR-91/001. Washington, 1991.

EPA – US Environmental Protection Agency. Guidelines for reproductive toxicity risk assessment. EPA/630/R-96/009. Washington, 1996.

EPA – US Environmental Protection Agency. Endocrine disruptors screening program – Report to Congress. Washington, 2000.

GARDINER, D. L.; MCCARTHY, J. S.; TRENHOLME, K. R. Malaria in the post-genomics era: light at the end of the tunnel or just another train? **Post grade Med. J.**, v. 81, p. 505-509, 2004.

GIAO, P. T.; de VRIES, P. J. Pharmacokinetics interactions of antimalarial agents. **Clinical Pharmacokinetic**, v. 40, n. 5, p. 343-373, 2001.

GOODMAN e GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2001.

GOODWING, B., MOORE, J. T. CAR: detailing new models. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 8, p. 437-441, ago. 2004.

GORDI, T.; LEPIST, E. I. Artemisinin derivatives: toxic for laboratory animals, safe for humans? **Toxicology Letter**, v. 147, p. 99-107, 2004.

GORDI, T. *et al.* A semiphysiological pharmacokinetic model for artemisinin in healthy subjects incorporating autoinduction of metabolism and saturable first-pass hepatic extraction. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 59, n. 2, p. 189-198, 2005.

GREENWOOD, B.; MUTABINGWA, T. Malaria in 2002. **Nature**, v. 415, p. 670-672, fev., 2002.

HAYNES, R. K.; KRISHNA, S. Artemisinins: activities and actions. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 1339-1346, set. 2004.

HAYNES, R. K.; VONWILLER, S. C. From Qinghao, marvelous herb of antiquity, to the antimalarial qinghaosu – and some remarkable new chemistry. **Accounts of Chemical Research**, v. 30, p. 73-79, set. 1997.

HANDSCHING, C.; MEYER, U. A. Regulatory network of lipid-sensing nuclear receptors: roles for CAR, PXR, LXR and FXR. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 433, p. 387-396, 2005.

HIEN, T. T.; WHITE, N. J. Qinghaosu. **The Lancet**, v. 341, n. 8845, p. 603-606, mar. 1993.

HUNG, L. N. *et al.* Single dose artemisinin-mefloquine versus mefloquine alone uncomplicated falciparum malaria. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, p. 191-194, 1997.

HURST, C. H.; WAXMAN, D. J. Environmental phthalate monoesters activate pregnane X receptor-mediated transcription. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 199, p. 266-274, mar. 2004.

IKEDA, S. *et al.* Functional analysis of four naturally occurring variants of human constitutive androstane receptor. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 86, p. 314-319, 2005.

IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change of UN (United Nations). Impacts, adaptation and vulnerability. **Working Group II Report**. Bruxelas, abr., 2007. Disponível em: <http://www.ipcc.ch/SPM13apr07.pdf>. Acesso em: 23 mai. 2007.

JACOBS, M. N.; DICKINS, M.; LEWIS, D. F. V. Homology modeling of the nuclear receptors: human oestrogen receptor β (hER β), the human pregnane-X-receptor IPXR), the Ah receptor (AhR) and the constitutive androstane receptor (CAR) ligand binding domains from the human oestrogen receptor α (hER α) crystal structure, and the human peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) ligand binding domain from the PPAR γ crystal structure. **Journal of Steroid Biochemistry e Molecular Biology**, v. 84, p. 117-132, 2003.

JAIN, D. C. *et al.* Isolation of high artemisinin-yielding clones of *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 993-1001, mai. 1996.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; CROFT, S. L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitol. Res.**, v. 90, suplemento, p. S55-S62, fev. 2003.

KLAYMAN, D. *et al.* Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**, v. 228, p. 1049-1055, mai. 1985.

KLIEWER, S. A *et al.* An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. **Cell Press**, v. 92, p. 73-82, jan. 1998.

KLIEWER, S. A *et al.* The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 5, p. 687-702, 2002.

KLIEWER, S. A. Pregnane X receptors: Predicting and preventing drug interactions. **Thrombosis Research**, v. 117, p. 133-136, ago. 2005.

KRETSCHMER, X. C.; BALDWIN, W. S. CAR e PXR: xenosensores or endocrine disruptors? **Chemico-Biological Interactions**, v. 155, p. 111-128, 2005.

LEE, M. R. *et al.* Plants against malaria part II: *Artemisia annua* (qinghaosu or the sweet wormwood). **J. R. Coll. Physicians Edinb**, v. 32, p. 300-305, 2002.

LI, A. P. *et al.* Effects of cytochrome P450 inducers on 17 α -ethinyloestradiol (EE₂) conjugation by primary human hepatocytes. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 48, p. 733-742, 1999.

LINARDI, R. L.; NATALINI, C. C. Multi-drug resistance (MDR1) gene and P-glycoprotein influence on pharmacokinetic and pharmacodynamic of therapeutic drugs. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 336-341, jan./fev. 2006.

LINZER, D. I.; FISCHER, S. J. The placenta and the prolactin family of hormones: regulation of the physiology of pregnancy. **Molecular Endocrinology**, v. 142, n. 2296-2303, 1999.

LONGO, M. *et al.* Effects of the antimalarial drug dihidroartemisinin (DHA) on rat embryo in vitro. **Reproductive Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 83-93, 2006a.

LONGO, M. *et al.* In vivo and in vitro investigations of the effects of the antimalarial drug dihidroartemisinin (DHA) on rat embryos. **Reproductive Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 797-810, 2006b.

LU, F. C. Reproductive evaluation: assessment of safety/risk. In: **Basic Toxicology: fundamentals, target organs, and risk assessment**. 2. ed. Miami: Taylor & Francis, 1991, p. 327-344.

MÄKINEN, J. *et al.* Dual action of oestrogens on the mouse constitutive androstane receptor. **Biochem. J.**, v. 376, p. 465-472, 2003.

MASUYAMA, H. *et al.* The expression of pregnane X receptor and its target gene, cytochrome P450 3A1, in perinatal mouse. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 172, p. 47-56, ago. 2001.

MASUYAMA, H. *et al.* Endocrine disrupting chemicals, phthalic acid and nonylphenol, activate pregnane X receptor-mediated transcription. **Mol. Endocrinol.**, v. 14, n. 3, p. 421-428, 2000.

McGREADY, R. *et al.* Artemisinin derivatives in the treatment of falciparum malaria in pregnancy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, p. 430-433, 1998.

McGREADY, R. *et al.* Artemisinin antimalarials in pregnancy: a prospective treatment study of 539 episodes of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 2009-2016, dez. 2001.

MESHINICK, S. R. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1655-1660, ago. 2002.

MIKAMO, E. *et al.* Endocrine disruptors induce cytochrome P450 by affecting transcriptional regulation via pregnane X receptor. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 193, p. 66-72, ago. 2003.

MILLER, B. H. *et al.* Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. **Current Biology**, v. 14, n. 1367-1376, ago. 2004

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária**. Brasília, 2003

MOHAN, A. R.; BENNETT, P. R. Drugs acting on the pregnant uterus. **Current Obstetric & Gynaecology**, v. 16, p. 174-480, 2006.

MUNRO, C. J. *et al.* The relationship of serum estradiol and progesterone concentration to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme-immunoassay and radioimmunoassay. **Clin Chem**, v. 37, p. 838-844, 1991.

MUTABINGWA, T. K. Artemisinin-based combination therapies (ACTs): best hope for malaria treatment but inaccessible to the needy! **Acta Tropica**, v. 95, p. 305-315, jun. 2005.

MYINT, H. Y. *et al.* A systematic overview of published antimalarial drug trials. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 73-81, 2004.

NELSON, D. R. Cytochrome P450 and the individuality of species. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 369, n. 1, p. 1-10, set. 1999.

NIDCD – National Institute on Deafness and Other Communication Disorders. Fooling *Anopheles*: scientists aims to wipe out malaria by outsmarting a mosquito's sense of smell. Out, 2002. Disponível em: <http://www.nidcd.nih.gov>. Acesso em: 10 mai 2007.

NOEDL, H. Artemisinin resistance: how can we find it? **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 9, p. 404-405, set. 2005.

OLIVEIRA, A. C. A. X.; DA-MATA, A. C.; PAUMGARTTEN, F. J. R. *Plasmodium berghei* (ANKA): Infections induces CYP2A5 and 2E1 while depressing other CYP isoforms in the mouse liver. **Experimental Parasitology**, n. 113, p. 256-261, mar. 2006.

OLLIARO, P. L.; TAYLOR, W. R. J. Antimalarial compounds: from bench to bedside. **The Journal of Experimental Biology**, n. 206, p. 3753-3759, ago. 2003.

ORTH, J. M.; GUNSALUS, G.; LAMPERTI A.A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on number of Sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology**, n. 122, p. 787-794, 1988.

PARAENSE, W. L. A Fragment of malaria history. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, p. 439-422, jun. 2002.

PASCUSI, J. M. *et al.* The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroids receptors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1619, p. 243-253, 2003.

PEREIRA, O. C. M. *et al.* Effects of prenatal hydrocortisone acetate exposure on fertility and sexual behavior in male rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 38, p. 36-42, 2003.

POSNER, G. H.; O'NEILL, P. M. Knowledge of the proposed chemical mechanism of action and cytochrome P450 metabolism of antimalarial trioxane like artemisinin allows rational desing of new antimalarial peroxides. **Accounts of Chemical Research**, v. 37, n. 6, p. 397-404, abr. 2004.

RANG, H.P. *et al.* **Farmacologia**. 5 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.

RICHIE, T. L. ; SAUL, A. Progress and challenges for malaria vaccines. **Nature**, v. 415, p. 694-701, fev. 2002.

RIDLEY, R. G. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. **Nature**, v. 415, p. 686-693, fev., 2002.

RODRIGUES, R. A. F. *et al.* Otimização do processo de extração e isolamento do antimalárico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 368-372, jan. 2006.

SACHS, J.; MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. **Nature**, v. 415, p. 680-685, fev. 2002.

SERRA, I. Rotas do paludismo. **RIHECOB – Red de Intercâmbios para la Historia e la Epistemologia de las Ciencias Químicas e Biológicas**. Lisboa, 2003. Disponível em: http://www.triplov.com/cictsul/isabel_serra.html. Acesso em: 19 jan. 2006.

SHAN, L. *et al.* Structure of the murine constitutive androstane receptor complexed to androstanol: a molecular basis for the inverse agonism. **Molecular Cell**, v. 16, p. 907-917, 2004.

SOUSA BRITO, A. R. M. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. Di Stasi, L. C.; Hiruma-Lima, C. A. Cap. 3, 3 ed., São Paulo: UNIFESP, 2003.

SPITZ, I. M.; LOOK, P. F. A.; BENNINK, H. J. T. C. The use of progesterone antagonists and the progesterone receptor modulators in contraception. **Steroids**, v. 65, p. 817-823, 2000.

STOCKBOWER, R. Malaria's cloaking device. **ARS Technica**. Jan., 2006. Disponível em: <http://arstechnica.com/journals/science.ars/2006/1/3/2288>. Acesso em: 18 mai. 2007.

SUÁREZ-MUTIS, M. C.; COURA, J. R. Mudanças no padrão epidemiológico da malária em área rural do médio Rio Negro, Amazônia brasileira: análise retrospectiva. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 4, p. 795-804, abr. 2007.

SVENSSON, U. S.; ASHTON, M. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the *in vitro* metabolism of artemisinin. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 48, p. 528-535, 1999.

TAUIL, P. *et al.* A malária no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, n.1, mar., 1985.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. Atheneu, 2 ed., São Paulo, 1999.

UHELMANN, A. C. *et al.* A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, n. 7, p. 628-629, jul. 2005.

VIGNATI, L. A. *et al.* A human and mouse pregnane X receptor reporter gene assay in combination with cytotoxicity measurements as a tool to evaluate species-specific CYP3A induction. **Toxicology**, v. 199, p. 23-33, 2004.

VITZTHUM, V. J. *et al.* A prospective study of early pregnancy loss in humans. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 2, p. 373-379, ago. 2006.

WAXMAN, D. J. P450 genes induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR e PPAR. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 369, n. 1, set. 1999.

WATKINS, R. E. *et al.* Coactivator binding promotes the specific interaction between ligand and the pregnane X receptor. **J. Mol. Biol.**, v. 331, p. 815-828, 2003 a.

WATKINS, R. E. *et al.* A Crystal structure of human PXR in complex with the St. John's wort compound hyperforin. **Biochemistry**, v. 42, p. 1430-1438, 2003 b.

WHITTY, C. J. M. *et al.* Averting a malaria disaster in Africa – where does the buck stop? **Bulletin of the World Health Organization**, v. 82, n. 5, p. 381-384, mai. 2004.

WHO – World Health Organization. **Assessment of the safety of artemisinin compounds in pregnancy**. Geneva, 2003.

WHO – World Health Organization / UNICEF – United Nations Children's Fund. **The Africa Malaria Report 2003**. Disponível em: http://www.afro.who.int/amd_2003/mainreport.pdf. Acesso em: 13 jan. 2006.

WHO – World Health Organization. **Roll Back Malaria**. Disponível em: <http://www.rmb.who.int>. Acesso em: 05 jan. 2006.

WILAIRATANA, P. *et al.* The future Outlook of antimalarial drugs and recent work on the treatment of malaria. **Archives of Medical Research**, v. 33, p. 416-421, 2002.

WOODROW, C. J.; HAYNES, R. K.; KRISHNA, S. Artemisinins. **Post grad Med. J.**, v. 81, p. 71-78, set. 2004.

WU, Y.; LIU, H. H. Probing the possible molecular origin of the highly selective toxicity of antimalarial peroxide qinghaosu (artemisinin). **Chem. Res. Toxicol.**, v. 16, p. 1202-1206, ago. 2003.

WU, Y. Commentary: How might qinghaosu (artemisinin) and related compounds kill the intraerythrocytic malaria parasite? A chemist's view. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 5, p. 255-259, mai. 2002.

YARRIS, L. Synthetic biology offers new help for malaria victims. **Science Beat**, mar. 2004. Disponível em: <http://www.lbl.gov/science-articles/archive/sb-PBD-anti-malarial.html>. Acesso em: 18 mai. 2007.

YOU, L. Steroid hormone biotransformation and xenobiotic induction of hepatic steroid metabolizing enzymes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 147, p. 233-246, jan. 2004.

ZENICK, H.; CLEGG, E. D. Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach. In: **Principles and methods of toxicology**. In: New York: Raven Press, 1989, p. 275-309.

ZHANG, H. *et al.* Rat pregnane X receptor: molecular cloning, tissue distribution and xenobiotic regulation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 368, n. 1, p. 14-22, ago. 1999.

ANEXOS

ANEXO A – SUBMISSÃO DO ARTIGO

Essa dissertação resultou no seguinte artigo, submetido à revista *Reproductive Toxicology* em 28 de maio de 2007:

Toxicity of Artemisinin (*Artemisia Annua* L.) in two different periods of pregnancy in Wistar rats

Ana C. Boareto ^a, Juliane C. Muller ^a, Aedra C. Bufalo ^a, Giuliana Kasecker ^a,
Samanta L. de Araujo ^a, Mary Ann Foglio ^b, Rosana N. de Moraes ^c,
Paulo R. Dalsenter ^a

^a Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba, 81531-990, PR, Brazil

^b CPQBA, State University of Campinas, Campinas, 13081-970, SP, Brazil

^c Department of Physiology, Federal University of Paraná, Curitiba, 81531-990, PR, Brazil

Abstract: Artemisinin compounds play an important role in treating multidrug-resistant malaria. Otherwise, the possible resorption and abnormalities observed in animal reproduction studies do not recommend artemisinin during the first trimester of pregnancy. In order to evaluate if artemisinin also interferes with organogenesis or fetal development, pregnant Wistar rats were treated by gavage with increasing doses (7, 35 and 70 mg/kg/day) of artemisinin in two critical periods (from days 7 to 13 or 14 to 20) of pregnancy. Despite data indicating decreased sensitivity on the effect of fetal growth or survival following dosing in later stages of pregnancy, the results of the present investigation indicate toxicity in both periods of treatment. The result showed that the treatment with 35 or 75 mg/kg of artemisinin caused high percentages of post-implantation losses associated to a trend in the maternal progesterone reduction and significant maternal testosterone decrease. These findings demonstrate that oral administration of artemisinin can affect the post-implantation development of embryo and fetus, placing at risk the normal gestation and the conception development.

Keywords: Artemisinin; Antimalarial drug; Malaria; Embryoletality; Reproductive toxicity; Wistar rats; Pregnancy.