

EVANA FIGUEIREDO JUNCKES DE SOUZA

**MODULAÇÃO DE EFEITOS ESTROGÊNICOS INDUZIDOS PELO
ARTESUNATO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, no Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter
Coorientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Boareto da Costa Cesar

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Souza, Evana Figueiredo Junckes de
Modulação de efeitos estrogênicos induzidos pelo artesanato. / Evana
Figueiredo Junckes de Souza. – Curitiba, 2016.
60f.: il. ; 30cm.

Orientador: Paulo Roberto Dalsenter
Coorientadora: Ana Cláudia Boareto da Costa Cesar

Dissertação(Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Artemisia. 2. Estrógenos I. Título II. Dalsenter, Paulo Roberto. III.
Cesar, Ana Cláudia Boareto da Costa. IV. Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.1





MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em FARMACOLOGIA
Código CAPES: 40001016038P0

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FARMACOLOGIA

No dia vinte e quatro de Junho de dois mil e dezesseis às 09:30 horas, na sala 107 - Anfiteatro, Centro Politécnico, do Setor de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS da Universidade Federal do Paraná, foram instalados os trabalhos de arguição da mestranda **EVANA FIGUEIREDO JUNKES DE SOUZA** para a Defesa Pública de sua Dissertação intitulada: "**MODULAÇÃO DE EFEITOS ESTROGÊNICOS INDUZIDOS PELO ARTESUNATO**". A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: PAULO ROBERTO DALSENTER (UFPR), CLAUDIO DA CUNHA (UFPR), EMERSON LUIZ BOTELHO LOURENÇO (UNIPAR). Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais e, depois, solicitou que os presentes e a mestranda deixassem a sala. A Banca Examinadora, então, reuniu-se sigilosamente e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela APROVAÇÃO da aluna. A mestranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, PAULO ROBERTO DALSENTER, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 24 de Junho de 2016.


Prof PAULO ROBERTO DALSENTER
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


Prof CLAUDIO DA CUNHA
Avaliador Interno (UFPR)


Prof EMERSON LUIZ BOTELHO LOURENÇO
Avaliador Externo (UNIPAR)

Dedico este trabalho ao meu amor, Rodrigo, que me acompanhou e apoiou durante essa difícil e enriquecedora jornada. Aos meus pais, Evaldo e Giovana. Serei eternamente grata a tudo que eles fizeram por mim e meus irmãos. Às minhas mimosas, Sexta e Tigrina, que completam nossa família e sempre fazem meus dias mais felizes.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter pela coragem em aceitar o desafio de me orientar em condições especiais, pela confiança, pelo acompanhamento e pelos ensinamentos.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Ana Cláudia Boareto da Costa César, pelo carinho, paciência, ajuda e compreensão.

À todos os colegas e amigos de trabalho e convivência: Janiana, Cláudia, Débora, Larissa, Francislaine, Maria Carolina, Eliana, Marcella, Lorena, Caroline, Jonas e Ana Cláudia.

À comissão de representantes discentes: Adriano, Bruna, Débora e Luiz. Agradeço a vocês pelo apoio.

Aos funcionários da farmacologia e do biotério: Silvia, Eli, Paty, Nair, Gisele, Gabriela, Iraci, Julia, Iselen, Gilmara e Luana.

Ao meu amor, marido e companheiro Rodrigo, que mesmo distante se fez presente, por me apoiar em todos os momentos e por auxiliar nas figuras do artigo e da dissertação.

Agradeço a todos que passaram pela minha vida nesta fase e me modificaram de alguma forma. Se hoje sou melhor que ontem, devo isso a cada um de vocês.

“O assunto mais importante do mundo pode ser simplificado até ao ponto em que todos possam apreciá-lo e compreendê-lo. Isso é - ou deveria ser - a mais elevada forma de arte”.

Charles Chaplin

RESUMO

O artesunato é um derivado da artemisinina, que tem origem da planta chinesa *Artemisia annua*, usado no tratamento de malária *falciparum*. Seu uso não é indicado no primeiro trimestre de gestação devido a efeitos tóxicos para o embrião e feto demonstrados em estudos *in vivo*. Além disso, a artemisinina e alguns de seus derivados já apresentaram toxicidade reprodutiva. Os estrogênios estão envolvidos em processos fisiológicos e patológicos dos tratos reprodutores feminino e masculino. Ademais, alterações sexuais e reprodutivas podem estar relacionadas com a exposição a substâncias estrogênicas. Apesar de indícios de toxicidade reprodutiva do artesunato, nenhum trabalho verificou atividade estrogênica ou antiestrogênica desse fármaco. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito estrogênico e antiestrogênico do artesunato sobre o útero. Para este fim, foi realizado o teste uterotrófico em ratas imaturas, tratadas com artesunato isolado e associado ao estradiol. O artesunato foi testado em diferentes doses (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/kg), por via oral. A análise histomorfométrica das camadas uterinas (perimétrio, miométrio, endométrio e epitélio) foi realizada de forma cega manualmente e através do programa *Image J*[®]. Os resultados do teste uterotrófico demonstraram aumento uterino no grupo de ratas tratadas com artesunato na dose de 12,5 mg/kg, o que sugere estrogenicidade. Ademais, o tratamento com artesunato nas doses de 6,25 e 12,5 mg/kg combinado com estradiol aumentou a massa uterina quando ambos foram administrados pela mesma via (oral). A alteração da via de administração do estradiol (subcutânea) em associação com artesunato não apresentou diferença na massa uterina, sugerindo que o efeito estrogênico observado possa estar relacionado com a via de administração oral. Os animais tratados com as doses de 50 e 100 mg/kg de artesunato não apresentaram antagonismo quando associadas ao estradiol (na dose de 5 µg/kg, s.c.), diferentemente do modulador de receptores estrogênicos, o tamoxifeno. Os resultados histomorfométricos foram coerentes com os testes uterotróficos, demonstrando que as fêmeas tratadas com artesunato na dose de 12,5 mg/kg tiveram as espessuras do endométrio e epitélio aumentadas. A associação de estradiol (por via oral) com artesunato na dose de 6,25 mg/kg aumentou a espessura do perimétrio, miométrio e endométrio. O grupo tratado com estradiol combinado ao artesunato na dose de 100 mg/kg apresentou redução do miométrio e endométrio. O tratamento por via subcutânea de estradiol na dose de 0,3 µg/kg associada com artesunato nas doses 6,25; 12,5 e 25 mg/kg aumentou a espessura do perimétrio, miométrio e endométrio. Já a associação do estradiol, 1 µg/kg, s.c., com artesunato em todas as doses, aumentou todas as camadas uterinas. Além do mais, as espessuras do miométrio, endométrio e epitélio foram aumentadas em todos os animais tratados com a associação de estradiol subcutâneo na dose de 5 µg/kg. Deste modo, podemos concluir que o artesunato tem efeito estrogênico, e apresenta efeito modulador da resposta estrogênica mediada por baixas doses de estradiol, quando a administração de ambos se dá pela via oral.

Palavras-chave: *Artemisia annua*. Artesunato. Estrogenicidade. Teste uterotrófico.

ABSTRACT

Artesunate is a derivative of artemisinin, originates from the Chinese plant *Artemisia annua*, used for treatment of *falciparum* malaria. It is not indicated in the first trimester of pregnancy due toxic effects to the embryo and fetus demonstrated *in vivo* studies. Besides that, artemisinin and its derivatives have presented reproductive toxicity. Estrogenic compounds are involved with physiological and pathological processes female and male reproductive tracts. Sexual and reproductive changes may be related to exposure estrogenic compounds. Despite the evidence of reproductive toxicity of artesunate, none study found estrogenic or antiestrogenic activity of this drug. The aim of this study was to evaluate estrogenic and antiestrogenic effects of artesunate on the uterus. To this end, the uterotrophic test carried out with immature female rats. They were treated with artesunate isolated and combined with estradiol. The doses tested of artesunate were 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 mg/kg, orally. Histomorphometric analysis of uterine layers (perimetrium, myometrium, endometrium and epithelium) was performed blind and manually through the software Image J[®]. Results of uterotrophic test showed that the group of animals treated with artesunate at dose of 12.5 mg/kg had uterine weight gain, suggesting estrogenicity. Moreover, treatment with artesunate at the doses of 6.25 and 12.5 mg/kg estradiol increased the uterine weight when both were administered by the same route (oral). The change of estradiol administration (subcutaneous) in combination with artesunate showed no difference in uterine weight, suggesting that the estrogenic effect observed may be related to the oral route of administration. The animals treated with artesunate doses of 50 and 100 mg/kg showed no antagonism when combined with estradiol (5 µg/kg, s.c.), unlike estrogen receptor modulator, tamoxifen. Histomorphometric results were consistent with the uterotrophic test, showing that animals treated with artesunate at a dose of 12.5 mg/kg had endometrial thickness and epithelium increased. The combination of estradiol with artesunate orally at a dose of 6.25 mg/kg perimetrium increased thickness, myometrium and endometrium. The group treated with estradiol combined with in artesunate 100 mg/kg decreased the myometrium and endometrium as compared to the group treated with oral estradiol. The treatment via subcutaneous estradiol (0.3 µg/kg) associated with artesunate at the doses 6.25; 12.5 and 25 mg/kg increased the thickness of perimetrium, myometrium and endometrium. The combination of estradiol (1 µg/kg, s.c.) and artesunate at all doses increased uterine layers. The thickness of the myometrium, endometrium and epithelium was increased in all animals treated with the combination of estradiol subcutaneously at dose of 5 µg/kg. Thus, we can conclude that the artesunate has estrogenic effect and modulates estradiol response at low doses when the administration of both is oral.

Key words: *Artemisia annua*. Artesunate. Estrogenicity. Uterotrophic test.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 REPRESENTAÇÃO DO CICLO EVOLUTIVO DO <i>PLASMODIUM VIVAX</i> E <i>P. OVALE</i> EM HUMANOS	17
FIGURA 2 ESTRUTURA QUÍMICA DA ARTEMISININA E SEUS DERIVADOS	21
FIGURA 3 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS SÍTIOS DE DIÉRESE EM TRATO REPRODUTOR FEMININO DE <i>RATUS NORVEGICUS</i>	31
FIGURA 4 ESQUEMA DE PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.	34
FIGURA 5 REPRESENTAÇÃO DAS CAMADAS UTERINAS.....	35
FIGURA 6 MASSA RELATIVA DO ÚTERO VAZIO DOS GRUPOS TRATADOS COM ARTESUNATO ISOLADO ORAL.....	36
FIGURA 7 MASSA RELATIVA DO ÚTERO VAZIO DOS GRUPOS TRATADOS COM ESTRADIOL ORAL ASSOCIADO AO ARTESUNATO ORAL.	36
FIGURA 8 MASSA RELATIVA DO ÚTERO VAZIO DOS GRUPOS TRATADOS COM ESTRADIOL SUBCUTÂNEO ASSOCIADO AO ARTESUNATO ORAL.	37
FIGURA 9 MASSA RELATIVA DO ÚTERO VAZIO DOS GRUPOS TRATADOS COM ESTRADIOL SUBCUTÂNEO ASSOCIADO AO ARTESUNATO ORAL	38
FIGURA 10 MASSA RELATIVA DO ÚTERO VAZIO DOS GRUPOS TRATADOS COM ESTRADIOL ASSOCIADO AO TAMOXIFENO OU ARTESUNATO ORAL.	38
FIGURA 11 MASSA RELATIVA DO ÚTERO VAZIO DOS GRUPOS TRATADOS COM ESTRADIOL.	39
FIGURA 12 ESPESSURA DAS CAMADAS UTERINAS DO TRATAMENTO COM ARTESUNATO ISOLADO ORAL.....	40
FIGURA 13 CORTES HISTOLÓGICOS REPRESENTATIVOS DOS CORNOS UTERINOS DE RATAS TRATADAS COM ARTESUNATO ORAL.	41
FIGURA 14 ESPESSURA DAS CAMADAS UTERINAS DO TRATAMENTO COM ESTRADIOL ORAL ASSOCIADO AO ARTESUNATO ORAL.	42
FIGURA 15 CORTES HISTOLÓGICOS REPRESENTATIVOS DOS CORNOS UTERINOS DE RATAS TRATADAS COM ESTRADIOL ORAL ASSOCIADO AO ARTESUNATO ORAL.....	42
FIGURA 16 ESPESSURA DAS CAMADAS UTERINAS DO TRATAMENTO COM ESTRADIOL SUBCUTÂNEO ASSOCIADO AO ARTESUNATO ORAL.	43

FIGURA 17 CORTES HISTOLÓGICOS REPRESENTATIVOS DOS CORNOS UTERINOS DE RATAS TRATADAS COM ESTRADIOL SUBCUTÂNEO ASSOCIADO AO ARTESUNATO ORAL.....	44
FIGURA 18 ESPESSURA DAS CAMADAS UTERINAS DO TRATAMENTO COM ESTRADIOL SUBCUTÂNEO ASSOCIADO AO ARTESUNATO ORAL.	44
FIGURA 19 CORTES HISTOLÓGICOS REPRESENTATIVOS DOS CORNOS UTERINOS DE RATAS TRATADAS COM ESTRADIOL SUBCUTÂNEO ASSOCIADO AO ARTESUNATO ORAL.....	45
FIGURA 20 ESPESSURA DAS CAMADAS UTERINAS DO TRATAMENTO COM ESTRADIOL SUBCUTÂNEO ASSOCIADO AO TAMOXIFENO E ARTESUNATO ORAL.....	46
FIGURA 21 CORTES HISTOLÓGICOS REPRESENTATIVOS DOS CORNOS UTERINOS DE RATAS TRATADAS COM ESTRADIOL SUBCUTÂNEO ASSOCIADO AO TAMOXIFENO E ARTESUNATO ORAL.....	46

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 MALÁRIA	16
2.2 MALÁRIA <i>FALCIPARUM</i>	18
2.3 TRATAMENTO DA MALÁRIA <i>FALCIPARUM</i>	19
2.4 DERIVADOS DA ARTEMISININA	21
2.4.1 Mecanismo de ação dos derivados da artemisinina	22
2.5 ARTESUNATO.....	24
2.6 TOXICIDADE REPRODUTIVA DOS DERIVADOS DA ARTEMISININA	25
2.6.1 Ações sobre o embrião e feto.....	25
2.6.2 Ações sobre o trato reprodutor feminino e masculino	26
2.7 ESTROGENICIDADE E SUBSTÂNCIAS ESTROGÊNICAS.....	27
3. JUSTIFICATIVA	29
4. OBJETIVO GERAL	29
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
5. MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1. ANIMAIS.....	30
5.2. FÁRMACOS, DOSES E TRATAMENTOS	30
5.3. TESTE UTEROTRÓFICO EM RATAS IMATURAS	31
5.3.1. Teste de estrogenicidade	31
5.3.2. Teste de antiestrogenicidade por vias de administração oral e subcutânea ..	32
5.4. HISTOMORFOMETRIA.....	34
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
7. RESULTADOS	35
7.1. TESTE DE ESTROGENICIDADE UTEROTRÓFICO.....	35
7.2. TESTE DE ANTIESTROGENICIDADE POR VIAS DE ADMINISTRAÇÃO ORAL E SUBCUTÂNEA DO ESTRADIOL.....	36
7.3. TESTE DE ANTAGONISMO DOS RECEPTORES ESTROGÊNICOS UTERINOS.....	38
7.4. EFEITOS DO ESTRADIOL SOBRE A MASSA UTERINA.....	39
7.5. HISTOMORFOMETRIA.....	40
7.5.1. Histomorfometria dos grupos tratados com artesunato isolado	40

7.5.2. Histomorfometria dos grupos tratados com estradiol oral associado ao artesunato.....	41
7.5.3. Histomorfometria dos grupos tratados com estradiol subcutâneo associado ao artesunato.....	43
7.5.4. Histomorfometria dos grupos tratados com estradiol subcutâneo associado ao tamoxifeno e artesunato.....	45
8. DISCUSSÃO	47
9. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	53
ANEXO 1 CURVA DOSE-RESPOSTA DE ESTRADIOL ORAL.....	61

1. INTRODUÇÃO

A malária (paludismo, febre-terçã) é uma doença infecciosa com sintomas iniciais inespecíficos, transmitida pela picada da fêmea do mosquito anofelino contaminada com protozoários do gênero *Plasmodium*. Quando tratada adequadamente em fases iniciais, tende a remissão completa, no entanto, sem um tratamento correto, especialmente em malária por *P. falciparum*, o paciente pode desenvolver quadro severo e potencialmente letal (AGUIAR, et al., 2012; GREENWOOD, et al., 2008; LEITE, et al., 2013; WHO, 2015).

A malária é endêmica em diversos países tropicais da África, América Central, América do Sul e Ásia. Em 2015 foram notificados cerca de 214 milhões de casos, com 438 mil óbitos (AGUIAR, et al., 2012; WHO, 2015; WMD, 2016).

O desenvolvimento da primeira edição das “Diretrizes para o Tratamento da Malária” em 2006 pela Organização Mundial de Saúde (WHO – *World Health Organization*) possibilitou a atualização das políticas públicas direcionadas para o tratamento da protozoose. Neste documento há a inclusão da terapia combinada com artemisinina (ACT), nos países onde a malária por *P. falciparum* é endêmica. Este tratamento contribuiu globalmente para a redução da morbidade e da mortalidade relacionados à febre-terçã (TU, 2011; WHO, 2015).

Com exceção de mulheres no primeiro trimestre de gestação (em que há indicação de uso de quinina-clindamicina), a recomendação para o tratamento da malária não complicada, causada por *P. falciparum*, é a combinação de derivados da artemisinina, que agem rapidamente, com outros antimaláricos de ação prolongada, por três dias (artemeter-lumefantrina, artesunato-amodiaquina, artesunato-mefloquina, artesunato-sulfadoxina-pirimetamina e dihidroartemisinina-piperaquina). Em casos de malária severa se recomenda, mesmo para gestantes em todos os trimestres de gestação, artesunato (AS) (via intravenosa ou intramuscular) durante as primeiras 24 h até que se tolere a medicação oral, completando os três dias de ACT (MCGREADY, et al., 2006; WHO, 2015).

Os derivados da artemisinina foram desenvolvidos no final da década de 60, na China, através do programa de desenvolvimento de novas drogas com base na medicina tradicional local. O artesunato de sódio, um ácido succínico

monoéster derivado da artemisinina solúvel em água, foi desenvolvido para formulações injetáveis e apresentou fortes efeitos antimaláricos, sem toxicidade em estudos pré-clínicos. Esta substância age como um pró-fármaco: rapidamente distribuído e hidrolisado por esterases plasmáticas e por transformação hepática em dihidroartemisinina, que possui forte atividade antimalárica (AGTMAEL, EGGELTE e VAN BOXTEL, 1999; GOU, 2016; MERCEREAU-PUIJALON e FANDEUR, 2003; MESHNICK, TAYLOR e KAMCHONWONGPAISON, 1996; OLIVEIRA-FERREIRA, et al., 2010; TU, 2011).

O artesunato passou a ser utilizado na clínica em 1987, após ter demonstrado efeito terapêutico no tratamento de malária por *P. falciparum* e malária cerebral (GOU, 2016). A sua dose recomendada é 4 mg/kg, sempre associado a outros antimaláricos, para fornecer cura adequada e evitar resistência (WHO, 2015).

O mecanismo de ação do artesunato (e dos demais derivados da artemisinina) não está completamente elucidado, mas se acredita que o efeito antimalárico esteja relacionado com a formação de radicais livres. Nas fases sanguíneas, o parasita consome hemoglobina através de degradação enzimática em seus vacúolos digestórios. Com este processo, ocorre liberação de íons ferrosos e heme, que são transformados em hemozoína (inerte) pelo parasita. Acredita-se que os derivados da artemisinina se acumulem na célula infectada e através do heme e íons ferrosos liberem radicais livres de oxigênio e de carbono, desestruturando o parasita e eliminando a célula infectada (ECKSTEIN-LUDWIG, et al., 2003; GOU, 2016; MESHNICK, TAYLOR e KAMCHONWONGPAISON, 1996; MESHNICK, 2002; WANG, et al., 2015).

No trato reprodutor o artesunato causa toxicidade embrionária e fetal, levando a malformações e mortes (BOARETO, et al., 2012; CLARK, 2009; RATH, et al., 2010). Um estudo demonstrou que a artemisinina regula negativamente a expressão de receptor estrogênico alfa (RE α) reduzindo a atividade estrogênica do 17 β -estradiol (E2) em células de câncer de mama MCF-7, sugerindo que a artemisinina pode ser promissora alternativa no tratamento do câncer de mama (SUNDAR, et al., 2008). O tratamento de ratas prenhes com extrato de *Artemisia annua* também reduziu estrogênio sérico (ABOLAJI, et al., 2013). O artesunato apresentou toxicidade no trato reprodutor feminino, pois

reduziu os níveis séricos de progesterona e degenerou a decídua em fetos de ratas grávidas no início da gestação (LOU e ZHOU, 2001).

No trato reprodutor masculino, o artesunato pode suprimir a espermatogênese em ratos (JEWÓ, et al., 2008), lesar as células germinativas, comprometendo o mesmo trato em camundongos (SINGH, GIRI e GIRI, 2015). Além disso, o artesunato também reduz a motilidade espermática em cobaias (OBIANIME e APRIOKU, 2009).

O 17β -estradiol é um hormônio esteroide produzido e liberado pelas gônadas e é essencial para diversos processos fisiológicos, como o desenvolvimento sexual e reprodutivo em fêmeas e machos. Além disso, este hormônio também pode estar envolvido em processos patológicos, como desenvolvimento de endometriose e alguns tipos de neoplasias: mamária, endometrial e prostática. Algumas substâncias ambientais podem exercer atividade estrogênica e antiestrogênica provocando alterações sexuais indesejadas ou podendo ser usadas como alternativa terapêutica, respectivamente (GRUBER, et al., 2002; GUSTAFSSON, 2003; SHARPE e SKAKKEBAEK, 1993).

O artesunato é um importante antimalárico com grande potencial terapêutico, no entanto, existem evidências de toxicidade reprodutiva e faltam estudos sobre a sua interação com o sistema endócrino, inclusive sobre efeitos estrogênicos. O objetivo desse trabalho foi avaliar se o artesunato apresenta atividade estrogênica ou antiestrogênica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MALÁRIA

Malária, paludismo, febre intermitente e febre-terça são sinônimos de uma mesma doença causada pela infecção das hemácias por protozoário do gênero *Plasmodium*. São cinco as espécies de *Plasmodium spp.* capazes de causar malária em humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Destas, somente as quatro primeiras ocorrem no Brasil, sendo o *P. vivax* mais comum e *P. falciparum* o causador da forma mais grave da doença (BRASIL, 2010; BRASIL, 2014; LEITE, et al., 2013; WHO, 2015).

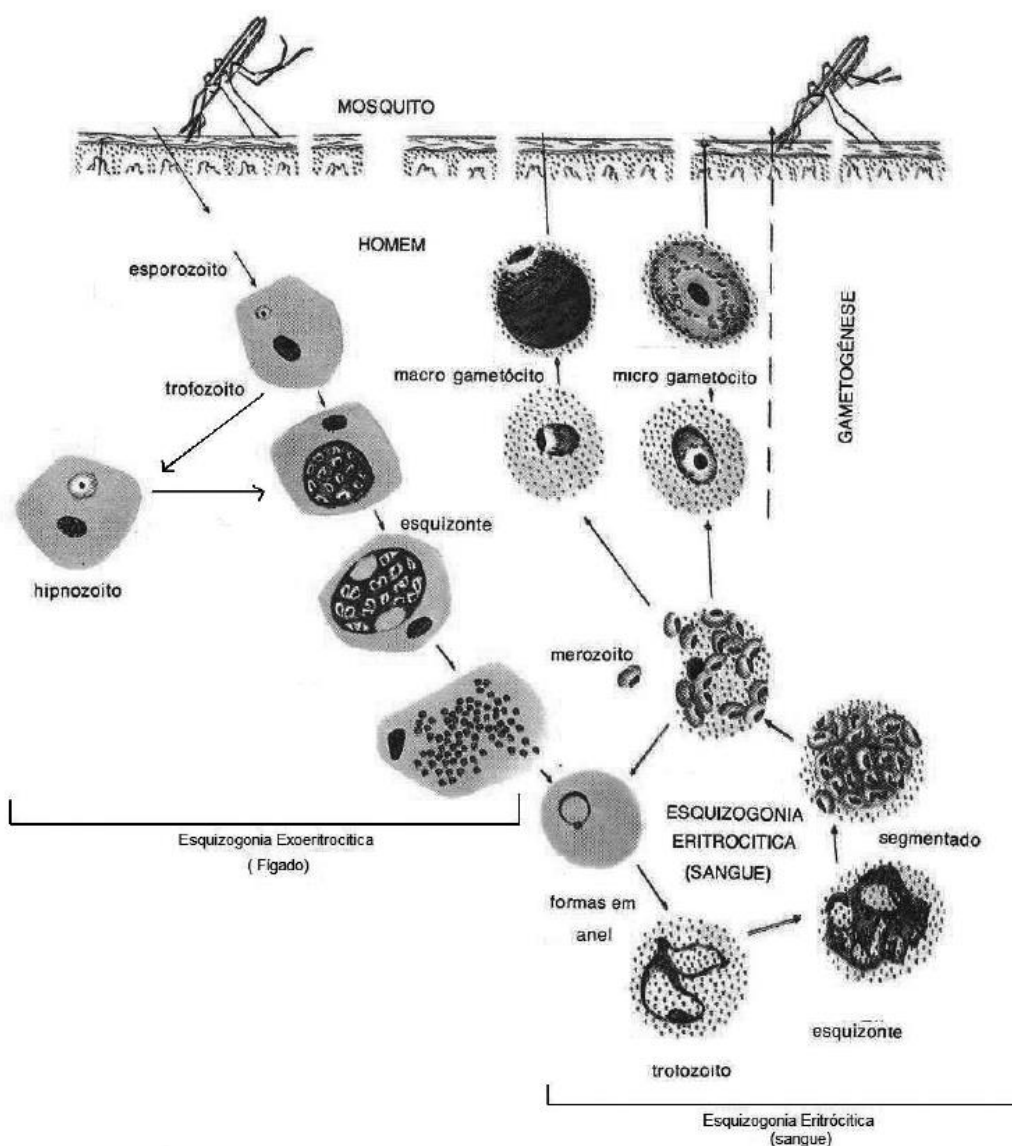
Existem 430 espécies de mosquito do gênero *Anopheles*, no entanto somente 60 delas são responsáveis pela transmissão da doença. A fêmea do mosquito anofelino é o hospedeiro definitivo do protozoário e vetor da malária em humanos (FRANÇA, DOS SANTOS, FIGUEIROA-VILLAR, 2008). O desenvolvimento do parasita no mosquito leva de 10 a 18 dias e depende da temperatura ambiente e umidade. Os mosquitos deste gênero são encontrados em todo o mundo, exceto a Antártida, e a espécie que transmite a malária varia de acordo com a região (CDC, 2015). No Brasil a espécie mais importante para transmissão da malária é *Anopheles darlingi*, que se reproduz em locais com água limpa, quente, sombreada, comum na região amazônica (BRASIL, 2010).

Inicialmente, as fêmeas de mosquito anofelino (*Anopheles*) são infectadas pelos gametócitos do parasita através do repasto sanguíneo. No inseto estes gametócitos (femininos e masculinos) se fundem formando um zigoto. Este se prende no intestino na forma de oocisto, levando de seis a 12 horas para se tornar um oocisto maduro. Os oocistos se rompem e liberam esporozoítos que migram para a saliva do anofelino (HAFALLA, SILVIE e MATUSCHEWSKI, 2011; LEITE, et al., 2013; WHO, 2015).

A infecção humana, apresentada na FIGURA 1, ocorre quando o mosquito inocula os esporozoítos do parasita através da picada. Um único anofelino infectado pode injetar até 200 esporozoítos. Estes, através da circulação, irão se depositar nos hepatócitos (ciclo exoeritrocítico) e se replicarão, dando origem aos esquizontes do estágio hepático. Os hepatócitos infectados se rompem e liberam merozoítos na corrente circulatória que infectam

os eritrócitos, iniciando uma fase chamada de esquizogonia sanguínea, em que se dá o início dos sintomas da malária. Dentro dos eritrócitos, os merozoítos se transformam em trofozoítos de forma anelar, que após a maturação formam esquizontes sanguíneos, liberam novos merozoítos para infecção de outras células sanguíneas (FERNANDEZ-ÁLVARO, et al., 2016; LEITE, et al., 2013; TARUN, et al., 2006; VINETZ, et al., 2012; WHO, 2015).

FIGURA 1 REPRESENTAÇÃO DO CICLO EVOLUTIVO DO *PLASMODIUM VIVAX* E *P. OVALE* EM HUMANOS



FONTE: BRASIL, 2010.

Dentro de alguns ciclos os merozoítos formam os gametócitos e o ciclo de transmissão da malária reinicia, uma vez que um mosquito não contaminado

suga o sangue de um indivíduo contaminado com gametócitos circulantes (BRUCE-CHWATT, 1985; PHIMPRAPHI, et al., 2008; LEITE, et al., 2013). Algumas espécies, como *P. vivax* e *P. ovale*, podem desenvolver hipnozoítos, um tipo específico de esporozoítos, que permanecem de forma latente no fígado, podendo ocasionar recaídas da doença entre três a nove semanas após tratamento. Por conta disso o tratamento é importante, pois um indivíduo pode ser fonte de retransmissão por mais de três anos (BRASIL, 2010; BRASIL, 2014; LEITE, et al., 2013).

A malária é uma enfermidade curável quando tratada de maneira e em tempo adequados, mas que apresenta sintomas não específicos no início da infecção, tais como dores de cabeça, prostração, fadiga, dores abdominais, musculares e articulares, febre, calafrios, sudorese, anorexia e vômito (BRASIL, 2010; GREENWOOD, et al., 2008; LEITE, et al., 2013; WHO, 2015).

Em 2015, 214 milhões de casos de malária foram notificados com 438 mil mortes em todo o mundo (WMD, 2016). É endêmica em diversos países tropicais da África, América Central e América do Sul e Ásia (WHO, 2015). No Brasil a malária é endêmica na região Amazônica e no restante do país existem poucas notificações. No ano de 2015 o número de notificações totais foi de 141.749 casos de malária no Brasil. Comparando com 2008, que apresentou mais de 300.000 notificações, houve uma redução nacional do número de casos de mais de 52% (BRASIL, 2010; BRASIL, 2016; WHO, 2015).

2.2 MALÁRIA *FALCIPARUM*

Os sinais e sintomas da malária podem variar de acordo com a espécie infectante, a quantidade na circulação e do nível de imunidade do paciente, podendo ser leve, moderado ou grave. Gestantes, idosos, imunocomprometidos e crianças formam um grupo onde a gravidade da malária costuma ser maior, e infecções por *P. falciparum* intensificam ainda mais o quadro (BRASIL, 2010; VINETZ, et al., 2012).

A malária não complicada pode ser causada pelo *P. falciparum* e é confirmada pelo teste rápido imunocromatográfico. Os sintomas são febre intermitente, calafrios e sudorese. Estas crises podem ser acompanhadas de dores no corpo, cefaleia, náuseas e vômitos (BRASIL, 2010).

O *P. falciparum* é responsável pela forma mais grave da doença que pode ocasionar insuficiência de órgãos e morte (VINETZ, et al., 2012). Os principais sintomas da malária severa são: prostração, confusão mental, dispneia, convulsão, hipotensão arterial, edema pulmonar, hemorragia, icterícia, hemoglobinúria, febre (acima de 41°C), oligúria e coma (malária cerebral). Nestes casos os exames laboratoriais apontam anemia grave, hipoglicemia, acidose metabólica e insuficiência renal (BRASIL, 2010; WHO, 2015). O *P. falciparum* pode ainda levar à malária placentária, por adesão à condroitina sulfato A (CSA) na placenta, especialmente perigosa durante a primeira gravidez, podendo levar ao aborto (SACHS e MALANEY, 2002; VINETZ, et al., 2012).

2.3 TRATAMENTO DA MALÁRIA *FALCIPARUM*

O tratamento da malária *falciparum* (para casos não complicados) empregado em diversos países, incluindo o Brasil, é feito combinando derivados quinolínicos com derivados da artemisinina (BALINT, 2001; MILLER, et al., 2013). No Brasil, o tratamento e a orientação sobre a malária são distribuídos de forma gratuita para o paciente através do Sistema Único de Saúde - SUS. O Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) procura se manter atualizado sobre novos medicamentos que possam surgir, ou alterações do tratamento a níveis mundiais (BRASIL, 2010).

Recentemente, a OMS elaborou um novo guia com diretrizes revisadas e atualizadas de acordo com a confiabilidade dos novos dados do Programa Global da Malária (WHO, 2015). Quanto ao tratamento da malária, existem alguns meios de atingir o ciclo evolutivo do parasita utilizado pelos medicamentos. Alguns deles agem interrompendo a esquizogonia sanguínea (exemplo: artemisininas e quinolinas), causadora das manifestações clínicas; outros destroem as formas de hipnozoítos, que ficam latentes nos hepatócitos, das espécies *P. vivax* e *P. ovale* (exemplo dessa classe: primaquina), diminuindo os casos de recaídas tardias, característica das duas espécies. O último modo de ação conhecido dos antimaláricos é através da interrupção do desenvolvimento dos gametócitos (forma sexuada), como é o caso dos derivados da artemisinina e primaquina, impedindo que mosquitos não

contaminados se tornem novos vetores da doença (BRASIL, 2010; TAUIL, et al., 1985).

Os esquemas de tratamento também dependem do tipo da malária, da idade e peso do paciente. Nos casos de malária grave em pacientes do grupo de risco, é realizada a hospitalização (WHO, 2015).

Para o tratamento de malária por *P. falciparum*, o número de medicamentos disponíveis é limitado, devido ao surgimento de formas resistentes do parasita a muitos antimaláricos (MYINT, et al., 2004). As infecções por *P. falciparum* não complicadas são tratadas por três dias com terapia combinada aos derivados da artemisinina (artemeter-lumefantrina, artesunato-amodiaquina, artesunato-mefloquina, artesunato-sulfadoxina-pirimetamina e dihidroartemisinina-piperaquina). Estes esquemas não são recomendados para gestantes durante o primeiro trimestre de gravidez e menores de seis meses, pois os derivados da artemisinina demonstraram em estudos *in vivo* que podem causar supressão temporária da eritropoiese fetal, resultando em reabsorção. O tratamento para gestantes no primeiro trimestre de gestação e menores de seis meses consiste em quinina associada a clindamicina. Em casos de malária severa se recomenda, mesmo para gestantes em todos os trimestres de gestação, artesunato injetável durante as primeiras 24 h, até que se tolere a medicação oral, completando os três dias de terapia combinada com derivados da artemisinina (DONDORP, et al., 2009; FERNANDEZ-ÁLVARO, et al., 2016; GOMES, et al., 2011; LEITE, et al., 2013; SÁ, 2011; WHO, 2015).

Infecções mistas devem ser tratadas utilizando inicialmente o tratamento para *P. falciparum* seguido por 10 dias de primaquina. Se a infecção for mista com *P. malarie* é recomendado seguir apenas o esquema de *P. falciparum* (BRASIL, 2010). Em casos de recrudescência (falha no tratamento) ou reinfeção, o tratamento é feito de acordo com a espécie infectante (WHO, 2015).

O combate à malária deve prever uma combinação de fatores, como a eliminação do vetor, o diagnóstico correto e tratamentos efetivos. Nos países onde a malária é endêmica ocorreu nos últimos anos a adequação do tratamento, através do uso de terapia combinada com derivados da artemisinina. Essa combinação foi muito importante para a redução mundial da morbidade e mortalidade pela doença. Apesar dos esforços realizados, existem relatos de

casos de resistência do *P. falciparum* aos derivados da artemisinina no sudeste da Ásia, o que pode ameaçar os ganhos que esta terapia combinada trouxe (LEITE, et al., 2013; WHO, 2015).

2.4 DERIVADOS DA ARTEMISININA

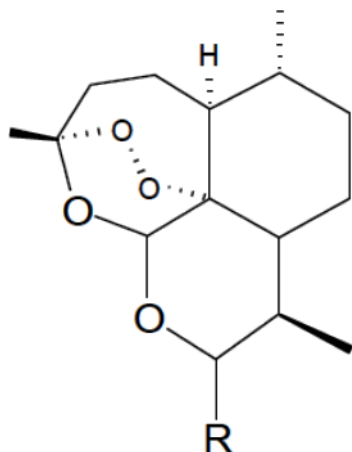
A artemisinina é uma sesquiterpeno lactona com ponte endoperóxido que tem origem na planta chinesa *Artemisia annua* L. (Asteraceae), utilizada como febrífuga há mais de 2.000 anos (AGTMAEL, EGGELTE e VAN BOXTEL, 1999). A artemisinina foi identificada pela pesquisadora chinesa YouYou Tu entre as décadas de 60 e 70. Essa identificação rendeu a pesquisadora o premio Nobel de medicina em 2015. (FERNANDEZ-ÁLVARO, et al., 2016; KLAYMAN, 1985; WHITE, HIEN e NOSTEN, 2015).

A extração da artemisinina é feita a partir das folhas e inflorescências com um rendimento baixo. A restrita concentração de artemisinina extraída é uma limitação para a produção em larga escala e o motivo de ser uma medicação de alto custo (JAIN, et al., 1996).

A insolubilidade da artemisinina impede a sua administração por várias vias, fazendo com que derivados semissintéticos mais solúveis fossem desenvolvidos (FIGURA 2) (TAVARES, 1999; WHITE, HIEN e NOSTEN, 2015). Cientistas obtiveram o artesunato, que é hidrossolúvel para administração intravenosa e o artemeter e arteeter, lipossolúveis, para administração intramuscular (AGTMAEL, EGGELTE e VAN BOXTEL, 1999). A artemisinina e seus derivados compõem um importante grupo de medicamentos antimaláricos. A ponte endoperóxido é fundamental para a ação contra o protozoário (HIEN e WHITE, 1993). A lactona é reduzida facilmente, formando dihidroartemisinina, que possui maior atividade antimalárica que a artemisinina (AVERY, et al., 2002).

Por possuírem rápida ação e potência, os derivados da artemisinina trouxeram uma nova esperança para o tratamento da malária severa, que era até então feito com quinina e tinha altas taxas de mortalidade (SEAQUAMAT, 2005; WHITE, HIEN e NOSTEN, 2015).

FIGURA 2 ESTRUTURA QUÍMICA DA ARTEMISININA E SEUS DERIVADOS



R	Composto
-O	Artemisinina (a)
OH	Diidroartemisinina (b)
OCH ₃	Artemeter (c)
OC ₂ H ₅	Arteeter (d)
OCO(CH ₂) ₂ COONa	Artesunato de sódio (e)

FONTE: (FRANÇA, DOS SANTOS e FIGUEIROA-VILLAR, 2008).

Os derivados da artemisinina são fármacos que agem sobre os eritrócitos infectados com trofozoítos em estágios anelares, provocando a rápida depuração da parasitemia. Esta ação é especialmente importante para a redução dos sintomas em casos de malária severa e também para a redução da retransmissão da doença (FERNANDEZ-ÁLVARO, et al., 2016; WHITE, HIEN e NOSTEN, 2015).

O uso combinado dos derivados da artemisinina com outros antimaláricos no tratamento de malária é capaz de impedir dois ciclos assexuados do parasita em três dias (período de tratamento com derivados da artemisinina), reduzindo consideravelmente o número de parasitas sanguíneos, bem como a resistência aos antimaláricos e sintomas da doença, acelerando a resposta terapêutica. A monoterapia dos derivados da artemisinina nunca é recomendada, para evitar riscos de resistência (WHITE, HIEN e NOSTEN, 2015; WHO, 2015).

2.4.1 Mecanismo de ação dos derivados da artemisinina

A artemisinina e seus derivados agem mais rapidamente sobre o *Plasmodium* que outros antimaláricos, pois inibem os estágios iniciais de desenvolvimento logo que invade os eritrócitos (HAYNES e KRISHNA, 2004). Diferente de outros antimaláricos que agem nos estágios tardios dos trofozoítos e esquizogonia, os derivados da artemisinina agem nos trofozoítos jovens e estágios anelares, impedindo o desenvolvimento sexual inicial na forma de

gametócitos, resultado na redução da transmissão da malária (AGTMAEL, EGGELTE e VAN BOXTEL, 1999). Não atuam nos estágios hepáticos do parasita (WOODROW, HAYNES e KRISHNA, 2004).

O mecanismo de ação antimalárica dos derivados da artemisinina envolve a formação de radicais livres, mas ainda é controverso (UHLEMANN, et al., 2005). Na fase sanguínea, o parasita consome hemoglobina por degradação enzimática em seus vacúolos alimentares liberando íons ferrosos e heme (O'NEILL, BARTON e WARD, 2010). Um possível mecanismo de ação sugere que os derivados da artemisinina se acumulam dentro dos eritrócitos parasitados e liberam radicais livres através da perda da ponte endoperóxido, predominantemente pelo heme e também pelo ferro (WANG, et al., 2015). Estes radicais livres de oxigênio e carbono desestabilizam a membrana e inibem as proteases de cisteína dos vacúolos. Os radicais carbono iniciam uma cascata de reações químicas transformando os trioxanos em seus intermediários, que levam a morte do *Plasmodium* (AGTMAEL, EGGELTE e VAN BOXTEL, 1999; ECKSTEIN-LUDWIG, et al., 2003; POSNER e O'NEILL, 2004).

A abertura da ponte peróxido permite a formação de intermediários da artemisinina que agem com radicais livres atípicos altamente reativos com proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (MESHNICK, 2002). Estes intermediários formados possuem toxicidade seletiva contra o parasita, sendo assim, os derivados da artemisinina em doses terapêuticas são considerados fármacos pouco tóxicos. A razão da seletividade pelo parasita e baixa toxicidade em humanos ainda não foram esclarecidas (ECKSTEIN-LUDWIG, et al., 2003; WU, 2002; WU e LIU, 2003).

Outro mecanismo de ação é sugerido por Uhlemann e colaboradores (2005), no qual os derivados da artemisinina inibem a enzima ATPase cálcio-dependente (PfATP6) do *P. falciparum*, com alta especificidade. No entanto, a relação com diferentes espécies de *Plasmodium* ainda não foi definida. (ECKSTEIN-LUDWIG, et al., 2003; LEITE, et al., 2013). Eles também podem alterar a homeostase do plasmódio por interação direta com flavina adenina dinucleotídeo (FADH), gerando espécies reativas de oxigênio (ERO) (HAYNES, et al., 2010). Sabe-se que os derivados da artemisinina são mais tóxicos em eritrócitos parasitados, que absorvem melhor o fármaco, quando comparado com eritrócitos sadios (ECKSTEIN-LUDWIG, et al., 2003).

2.5 ARTESUNATO

O artesunato é um sal hemissuccinato monoéster, hidrossolúvel, semissintético derivado da artemisinina, que passou a ser utilizado na clínica em 1987, após ter demonstrado efeito terapêutico no tratamento de malária por *P. falciparum* e malária cerebral e baixa toxicidade (GOU, 2016). Age como um pró-fármaco, sendo rapidamente hidrolisado, formando dihidroartemisinina, principal responsável pela ação antimalárica (MESHNICK, TAYLOR e KAMCHONWONGPAISON, 1996; WHO, 2015). Por ser um derivado hidrossolúvel, pode ser apresentado em diversas formas farmacêuticas e administrado por diversas vias (intravenoso, oral, retal e intramuscular) sendo mais rapidamente absorvido e hidrolisado. É o fármaco de escolha para o tratamento de malária cerebral (FERNANDEZ-ÁLVARO, et al., 2016; WHITE, HIEN e NOSTEN, 2015).

O tratamento da malária severa com artesunato pode ocasionar hemólise decorrente da rápida destruição dos estágios de anel do parasita dentro dos eritrócitos, que passam pelo baço e retornam a circulação com curto tempo de vida. Por possuir um baixo tempo de meia-vida, recomenda-se a associação do artesunato com outros antimaláricos, a fim de evitar recrudescência e resistência. Para essa finalidade, as associações feitas são: artesunato-amodiaquina, artesunato-mefloquina e artesunato-pirimetamina-sulfadoxina (AGTMAEL, EGGELTE e VAN BOXTEL, 1999; GOU, 2016; MERCEREAU-PUIJALON e FANDEUR, 2003; MESHNICK, TAYLOR e KAMCHONWONGPAISON, 1996; NOEDL, 2005; OLIVEIRA-FERREIRA, et al., 2010; TU, 2011). Diferente do artemeter, o artesunato começa a ser transformado em dihidroartemisinina por esterases plasmáticas, seguido por transformação hepática. A dihidroartemisinina, por sua vez, é metabolizada pelo fígado por glicuronidação sendo eliminada na urina (WHO, 2015).

O artesunato foi adotado em vários países para tratamento da malária, sem muitos efeitos colaterais graves ou evidências clínicas de resistência farmacológica. Recomenda-se que o fármaco seja usado na dose de 4 mg/kg, sempre associado a outros antimaláricos (DUFFY e MUTABINGWA, 2004; WHO, 2015). Quando associado com a mefloquina, o artesunato representa um

grande progresso para o tratamento da malária *falciparum* grave multirresistente (NEWTON e WHITE, 1999).

2.6 TOXICIDADE REPRODUTIVA DOS DERIVADOS DA ARTEMISININA

2.6.1 Ações sobre o embrião e feto

Os estudos sobre a toxicidade reprodutiva da artemisinina e derivados são geralmente relacionados a teratogenicidade e embriotoxicidade, com toxicidade mãe-feto no período gestacional (BOARETO, et al., 2008; KLAYMAN, 1985; LONGO, et al., 2006; WOODROW, HAYNES e KRISHNA, 2004).

Estudos pré-clínicos utilizando artemisinina observaram reabsorção embrionária dose-dependente e hérnia umbilical. O artemeter também demonstrou reabsorção embrionária em camundongos, ratos e coelhos. Relatos de abortos após a administração de dihidroartemisinina e artesunato foram observados em hamsters (CLARK, et al., 2004; KLAYMAN, 1985; LONGO, et al., 2006). Outros estudos realizados com derivados da artemisinina demonstraram retardo no desenvolvimento do esqueleto, anormalidades cardiovasculares, danos teciduais embrionários (CLARK, et al., 2004; LONGO, et al., 2006; WHITE, et al., 2006). O artesunato já foi descrito como tóxico para o trato reprodutor feminino, uma vez que reduz os níveis séricos de progesterona e degenera a decídua em fetos de ratas grávidas no início da gestação. (LOU e ZHOU, 2001). O artesunato também causa toxicidade embrionária e fetal, levando a malformações e mortes (BOARETO, et al., 2012; CLARK, 2009; RATH, et al., 2010).

O tratamento de ratas com artemisinina durante a gestação resultou em perda embrionária e fetal dose-dependente (BOARETO, et al., 2008). Também foi verificado que o tratamento de ratas gestantes com artesunato causa embriotoxicidade, atenuada quando combinada com mefloquina (BOARETO, et al., 2012; BOARETO, et al., 2013). O mecanismo de ação tóxica do artesunato foi descrito por White e colaboradores, em 2006: quando administrado em períodos críticos da gestação, induz a depleção de eritroblastos embrionários, resultando em anemia que pode induzir embrioletalidade ou dano celular,

causando anormalidades cardíacas, miopatia cardíaca e atraso no desenvolvimento dos membros e cauda.

Alguns estudos em humanos demonstraram efeitos adversos em gestantes que fizeram uso de derivados da artemisinina, como abortos, natimortos e baixo peso ao nascer (MCGREADY, et al., 1998; MCGREADY e NOSTEN, 1999; MCGREADY, et al., 2001; WANG, 1989). Existe uma série de dificuldades em se verificar efeitos adversos em gestantes, pois muitas vezes a gravidez é desconhecida durante o tratamento e a exposição é inadvertida. Outros fatores limitantes são: o primeiro trimestre de gestação é um período crítico de ocorrência de abortos, e gestantes são por vezes excluídas de triagens toxicológicas (KOVACS, RIJKEN e STERGACHIS, 2015). O uso da artemisinina e seus derivados em gestantes nos últimos trimestres de gestação é considerado seguro (BENJAMIM, et al., 2015; BURGER, et al., 2016; DONDORP, et al., 2005).

2.6.2 Ações sobre o trato reprodutor feminino e masculino

Além da importância como antimaláricos, os derivados da artemisinina vem sendo investigados como prósperos anticancerígenos, por inibição da angiogênese e crescimento celular em diversos modelos celulares (EFFERTH, et al., 2015). Neste sentido, a artemisinina já foi proposta como adjuvante na terapia de câncer de mama estrogênio-dependente, por redução da expressão de RE α em células de câncer de mama MCF-7 (SUNDAR, et al., 2008). Também já foi demonstrado que o extrato de *Artemisia annua* reduziu estrogênio sérico, sugerindo que a planta tenha uma promissora ação contraceptiva (ABOLAJI, et al., 2013; ABOLAJI, et al., 2014). A dihidroartemisinina apresentou reversão da perda óssea em fêmeas de camundongos ovariectomizadas, sugerindo que ela possa ser uma alternativa no tratamento da osteoporose (ZHOU, et al., 2016). A artemisinina, no entanto, pode causar toxicidade ao trato reprodutor feminino, desregulando o balanço hormonal de ratas não prenhes sem malária, através do aumento do estresse oxidativo no útero (FAROMBI, et al., 2015).

O tratamento de ratas prenhes com artemisinina provocou a redução dos níveis de testosterona materna, bem como diminuição da contagem espermática em prole (BOARETO, et al., 2008). Ademais, o artesunato suprimiu a

espermatogênese em ratos, reduziu a motilidade espermática em cobaias e lesou células germinativas com redução espermática no epidídimo e aumento das deformidades espermáticas em camundongos (FAROMBI, et al., 2014; JEWO, et al., 2008; OBIANIME e APRIOKU, 2009; SINGH, GIRI e GIRI, 2015). Seu uso prolongado pode induzir infertilidade masculina reversível em ratos (OLUMIDE e RAJI, 2011).

Alguns estudos têm avaliado a interação da artemisinina e seus derivados com o trato reprodutor, entretanto até o momento os efeitos do artesunato sobre a atividade estrogênica ainda não foram elucidados.

2.7 ESTROGENICIDADE E SUBSTÂNCIAS ESTROGÊNICAS

Os hormônios estrogênicos são esteroides sexuais que agem através de receptores (estrogênicos) e são essenciais para manutenção de funções reprodutoras e sexuais, como o desenvolvimento de características sexuais secundárias em fêmeas e maturação espermática em machos (GRUBER, et al., 2002; GUSTAFSSON, 2003). As ações estrogênicas mais conhecidas envolvem a morfogênese do útero, ovários, glândulas mamárias, próstata, pulmão e encéfalo. Além disso, exercem diversos efeitos nos aparelhos cardiovascular, linfático, musculoesquelético e sistema nervoso central (HELDRING, et al., 2007).

O estrogênio mais potente produzido pelo corpo é 17β -estradiol, que após metabolização pode formar estriol e estrona. Estes metabólitos agem como agonistas fracos dos receptores estrogênicos. Existem dois tipos de receptores estrogênicos conhecidos, $RE\alpha$ e $RE\beta$, que têm papéis distintos nos sistema nervoso central, linfático, esquelético e cardiovascular. O $RE\alpha$ tem sido alvo de fármacos para o tratamento de câncer de mama, através de substâncias sintéticas antagonistas e moduladoras estrogênicas. Entretanto, alguns efeitos indesejáveis podem ser verificados em tecidos não alvo, bem como resistência a terapia antiestrogênica. O $RE\beta$ pode ter ações opostas à isoforma α , promovendo um equilíbrio na resposta ao estradiol. Também é um importante alvo para fármacos (HELDRING, et al., 2007; NELSON, WARDELL e MCDONNELL, 2013; XU, LOVRES e MAUVAIS-JARVIS, 2016).

Diferentes dos demais receptores nucleares os receptores estrogênicos abrem um grande espaço para a ligação do 17β -estradiol, permitindo que outras substâncias possam interagir com estes receptores. Além disso, eles também apresentam afinidade por fitoestrogênios e mesmo contaminantes ambientais xenoestrógenos (BREITHAUPT, 2004; HELDRING, et al., 2007).

Os fitoestrogênios são considerados estrogênicos naturais presentes em extratos de plantas ou fungos, enquanto que os xenoestrógenos podem ser de origem química, incluindo produtos industrializados tais como pesticidas, plastificantes, tintas, cosméticos e contraceptivos (HAMPL, KUBATOVO e STARKA, 2014). Os contaminantes ambientais que agem nestes receptores podem interferir na sinalização endócrina em tecidos que respondem ao 17β -estradiol e são denominados desreguladores endócrinos (BECKER, et al., 2014; HELDRING, et al., 2007; XU, LOVRE e MAUVAIS-JARVIS, 2016).

Os desreguladores endócrinos são substâncias exógenas, ou uma mistura de substâncias, que afetam a função do sistema endócrino, podendo gerar efeitos adversos no organismo, na sua prole ou subpopulações (IPCS, 2002). Podem agir diretamente sobre os receptores hormonais ou indiretamente, interferindo na síntese ou na conversão de hormônios (WHO, 2013). Além disso, alguns desreguladores endócrinos têm efeitos sinérgicos ou aditivos com hormônios naturais (HAMPL, KUBATOVO e STARKA, 2014).

A exposição a substâncias estrogênicas pode comprometer a produção de testosterona em machos, levando à incompleta masculinização do aparelho urogenital; e em fêmeas pode reduzir a fertilidade e favorecer o desenvolvimento de endometriose e cânceres cérvico-vaginal, endometrial e mamário. Anormalidades no aparelho urogenital de adultos após a exposição *in utero* ao dietilestilbestrol (estrogênio sintético) são evidências disso (HELDRING, et al., 2007).

Por se tratar de uma preocupação recente, os dados epidemiológicos sobre os desreguladores endócrinos ainda são limitados, então os efeitos adversos destes compostos podem levar anos até serem descritos, dificultando estudos com humanos. Este fato torna ainda mais importante os estudos pré-clínicos com desreguladores endócrinos e seus possíveis efeitos adversos.

3. JUSTIFICATIVA

O artesunato é um importante antimalárico utilizado como primeira linha de tratamento da malária *falciparum* em diversos países, inclusive no Brasil. O fármaco tem mostrado também promissora atividade no tratamento do câncer. Existem estudos que demonstram que a exposição à artemisinina e seus derivados pode ocasionar toxicidade embrionária e fetal, bem como alterações nos tratos reprodutores feminino e masculino. Estudos *in vitro* realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram efeitos estrogênicos do artesunato combinado com estradiol (dados não publicados). Como não existe nenhum trabalho a respeito da ação (anti) estrogênica do artesunato, torna-se necessário a avaliação da sua atividade estrogênica e antiestrogênica *in vivo*, seja isolado ou em associação com o estradiol.

4. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a possível atividade estrogênica e/ou antiestrogênica *in vivo* do antimalárico artesunato.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigação da possível atividade estrogênica *in vivo* do artesunato em ratas imaturas através do teste uterotrófico;
- Verificação da possível atividade antiestrogênica *in vivo* do artesunato associado ao 17 α -etinilestradiol pelas vias de administração oral e subcutânea;
- Identificação de possível antagonismo dos receptores estrogênicos presentes no útero;
- Avaliação histomorfométrica das camadas uterinas de ratas tratadas com artesunato isolado e associado ao estradiol nas vias oral e subcutânea;

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. ANIMAIS

Para realização dos experimentos foram utilizadas ratas Wistar imaturas com $20 \pm$ um dia de vida, advindas do biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos durante o período de experimentação em local limpo, com controle de temperatura ($22 \pm$ dois °C), com ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água filtrada e ração. Os protocolos experimentais realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná com protocolo nº 942.

5.2. FÁRMACOS, DOSES E TRATAMENTOS

O artesunato foi obtido da Farmanguinhos-Fiocruz (Knoll-Abbott). As doses utilizadas foram calculadas através de critérios alométricos a partir da dose recomendada para seres humanos (4 mg/kg), segundo a fórmula apresentada a seguir:

$$\frac{\text{Dose total para o modelo} \times \text{Peso metabólico do animal modelo (PMAM)}}{\text{Peso metabólico do modelo (PMM)}}$$

A conversão de massa (kg) em peso metabólico (kcal) é realizada elevando a massa do animal à potência de 0,75 (NEVILL, 1994). Considerando o modelo para um humano de 70 kg e média de peso para uma rata imatura de 50 g, obteve-se o seguinte resultado:

$$\frac{280 \times 0,05^{0,75}}{70^{0,75}} = \frac{280 \times 0,105}{24,2} = 1,21 \text{ mg totais para cada animal}$$

Como peso médio do animal-alvo é 50 g, a dose foi de aproximadamente 25 mg/kg de artesunato por dia. As doses de artesunato testadas foram: 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/kg. O fármaco foi administrado por gavagem, uma única vez ao dia por três dias, em volume de 5 mL/kg.

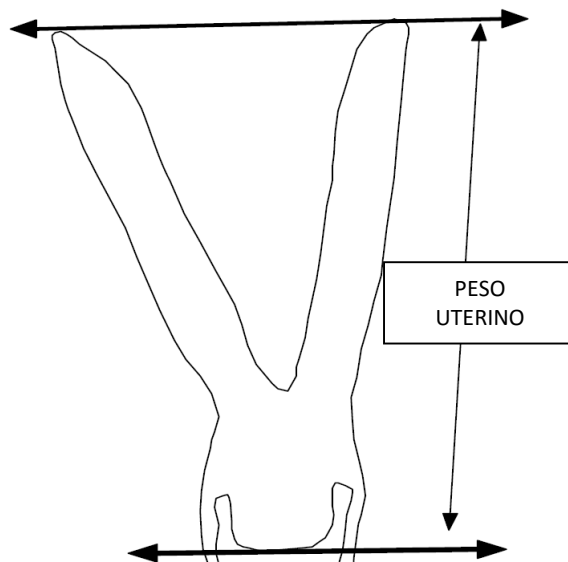
Para o estudo foi utilizado um grupo veículo, que recebeu óleo de canola (5 ml/kg, v.o.). O 17 α -etinilestradiol (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em óleo de canola e administrado por via oral na dose de 1 μ g/kg. O estradiol também foi administrado por via subcutânea (s.c.) nas doses de 0,3; 1 e 5 μ g/kg. O hidroxitamoxifeno (TMX) foi obtido da Sigma-Aldrich e dissolvido em água destilada com uma gota de Tween 80 e administrado oralmente na dose de 10 mg/kg.

5.3. TESTE UTEROTRÓFICO EM RATAS IMATURAS

5.3.1. Teste de estrogenicidade

O teste uterotrófico foi realizado a partir de metodologia descrita e validade (OECD, 2007). Diferentes grupos de ratas imaturas (21 \pm um dia) foram formados (sete a 10 animais por grupo) para investigar a possível atividade estrogênica do artesunato. Para esta finalidade os animais foram tratados diariamente (por três dias consecutivos) com as diferentes doses de artesunato (6,25 – 100 mg/kg) isoladas por via oral. O estradiol foi utilizado como controle positivo (1 μ g/kg/5 mL, v.o.) para estrogenicidade e o seu veículo (óleo de canola, 5 mL/kg, v.o.) serviu como controle negativo. Vinte e quatro horas após o último tratamento, os animais foram pesados, sedados e eutanasiados por deslocamento cervical. Os úteros foram removidos e seccionados logo abaixo da sua junção com a cérvix bem como na junção dos cornos uterinos com os ovários (FIGURA 3), dissecados cuidadosamente para retirada do tecido conectivo adjacente e pesados cheios e vazios. As massas relativas dos úteros vazios foram determinadas em porcentagem, em relação ao peso corporal do animal no dia da eutanásia e expressas como massa relativa uterina (%).

FIGURA 3 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS SÍTIOS DE DIÉRESE EM TRATO REPRODUTOR FEMININO DE *RATUS NORVEGICUS*



FONTE: Adaptado de PROTOCOLO OECD 440 (2007).

Todos os grupos experimentais foram tratados oralmente por três dias em um volume de 5 mL/kg, e estão apresentados abaixo:

- 1) Veículo (Óleo de canola, 5 mL/kg)
- 2) EE (17α -etinilestradiol, 1 μ g/kg)
- 3) AS (Artesunato 6,25 mg/kg)
- 4) AS 12,5 mg/kg
- 5) AS 25 mg/kg
- 6) AS 50 mg/kg
- 7) AS 100 mg/kg

5.3.2. Teste de antiestrogenicidade por vias de administração oral e subcutânea

Diferentes grupos de ratas imaturas foram formados para investigar a possível atividade antiestrogênica do artesunato associado ao estradiol. Os animais foram tratados diariamente por três dias consecutivos com as diferentes doses (6,25 – 100 mg/kg) de artesunato associadas ao estradiol por via oral na dose de 1 μ g/kg. Esta dose de estradiol por via oral é recomendada pela OECD pois apresenta aproximadamente 50% do efeito máximo (KANNO, et al., 2001). Além disso, o nosso grupo de pesquisa também padronizou esta dose de estradiol para a realização do teste uterotrófico, através de uma curva dose-resposta, na qual a dose de 1 μ g/kg também demonstrou aproximadamente 50% do efeito máximo (ANEXO 1).

A antiestrogenicidade também foi testada utilizando o estradiol por via subcutânea. Outros grupos de animais foram tratados diariamente por três dias consecutivos com as diferentes doses de artesunato (6,25 – 100 mg/kg) associadas ao estradiol (s.c.) na dose de 0,3 µg/kg. A dose de 0,3 µg/kg de estradiol por essa via é recomendada pela OECD por apresentar aproximadamente 50% do efeito máximo (KANNO, et al., 2001).

A dose de 1 µg/kg de estradiol por via subcutânea também foi testada a fim de verificar se haveria diferenças uterotróficas apenas em relação a via de administração.

Os grupos experimentais estão apresentados abaixo:

Estradiol oral (1 µg/kg)	Estradiol subcutâneo (0,3 µg/kg)	Estradiol subcutâneo (1 µg/kg)
Veículo	Veículo	Veículo
EE	EE	EE
EE-AS 6,25 mg/kg	EE-AS 6,25 mg/kg	EE-AS 6,25 mg/kg
EE-AS 12,5 mg/kg	EE-AS 12,5 mg/kg	EE-AS 12,5 mg/kg
EE-AS 25 mg/kg	EE-AS 25 mg/kg	EE-AS 25 mg/kg
EE-AS 50 mg/kg	EE-AS 50 mg/kg	EE-AS 50 mg/kg
EE-AS 100 mg/kg	EE-AS 100 mg/kg	EE-AS 100 mg/kg

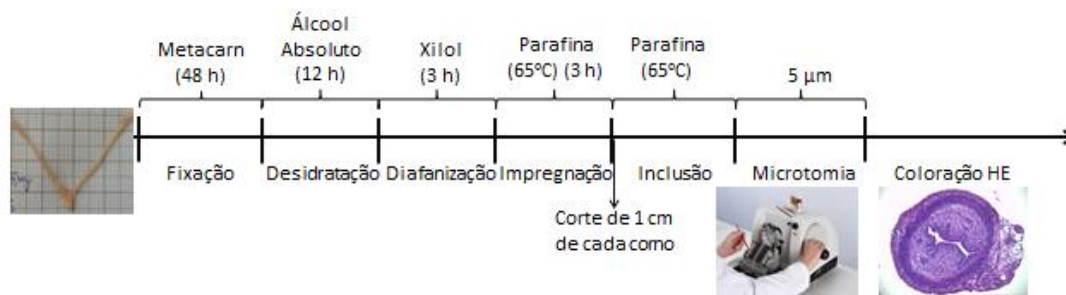
Com o intuito de verificar antagonismo dos receptores estrogênicos presentes no útero, um novo teste foi realizado com associação de estradiol (5 µg/kg, s.c.) e artesunato nas doses 50 e 100 mg/kg. O tamoxifeno (10 mg/kg, v.o.) foi utilizado como controle positivo de antiestrogenicidade associado ao estradiol 5 µg/kg, s.c. O tamoxifeno é um modulador seletivo dos receptores estrogênicos (MSRE), podendo agir com agonista parcial ou antagonista. Essa ação é dose-dependente. Portanto, para que fosse verificado efeito antagonista do tamoxifeno foi necessário associá-lo a uma alta dose de estradiol (5 µg/kg, s.c.). Os grupos formados estão dispostos abaixo:

- 1) Veículo
- 2) EE (5 µg/kg, s.c.)
- 3) EE-TMX (10 mg/kg)
- 4) EE-AS 50 mg/kg
- 5) EE-AS 100 mg/kg

5.4. HISTOMORFOMETRIA

Para a realização da histologia, após a eutanásia dos animais seus úteros foram coletados e fixados em *Metacarn* por 48 horas. Posteriormente, foram desidratados (em álcool absoluto por 12 horas), diafanizados (xilol por três horas), impregnados em parafina derretida (três horas). Em seguida, os cornos foram cortados (um centímetro) e incluídos verticalmente em parafina. As amostras foram seccionadas a cinco µm em micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina (HE) (FIGURA 4). Imagens digitais foram capturadas em microscópio de luz, Olympus BX51, no aumento de 100 x e resolução de 2070x1548 para análise morfométrica.

FIGURA 4 ESQUEMA DE PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.



FONTE: A autora (2016).

A análise morfométrica foi realizada manualmente de forma cega através do programa *Image J*[®] (*Image J 1.47v, National Institutes of Health, USA*) padronizado em 1440 pixels/µm. Foram utilizados cinco cornos uterinos de cada grupo. As medidas verificadas (FIGURA 5) foram: espessura total do perimétrio, espessura total do miométrio, espessura total do endométrio, espessura total do epitélio endometrial. Para todas as camadas uterinas foram medidos 20 campos diferentes em cada amostra.

FIGURA 5 REPRESENTAÇÃO DAS CAMADAS UTERINAS



P = representação do perimétrio; M = miométrio; En = endométrio e Ep = epitélio endometrial.
FONTE: A autora (2016).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

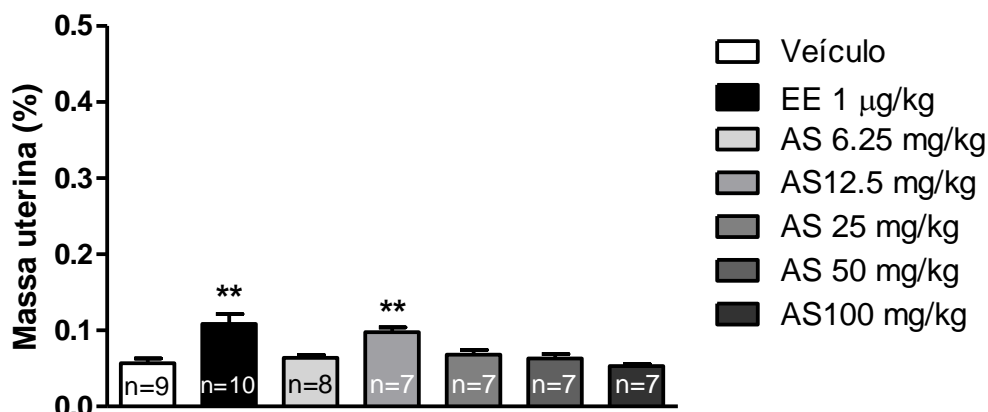
Os dados paramétricos foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via e as diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste de Bonferroni. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1. TESTE DE ESTROGENICIDADE UTEROTRÓFICO

No grupo controle positivo para estrogenicidade, os animais que receberam estradiol mostraram um aumento na massa relativa do útero vazio quando comparados ao veículo. Pode ser observado que o artesunato isolado na dose de 12,5 mg/kg aumentou a massa uterina em comparação com o veículo, como apresentado na FIGURA 6.

FIGURA 6 MASSA RELATIVA DO ÚTERO VAZIO DOS GRUPOS TRATADOS COM ARTESUNATO ISOLADO ORAL.

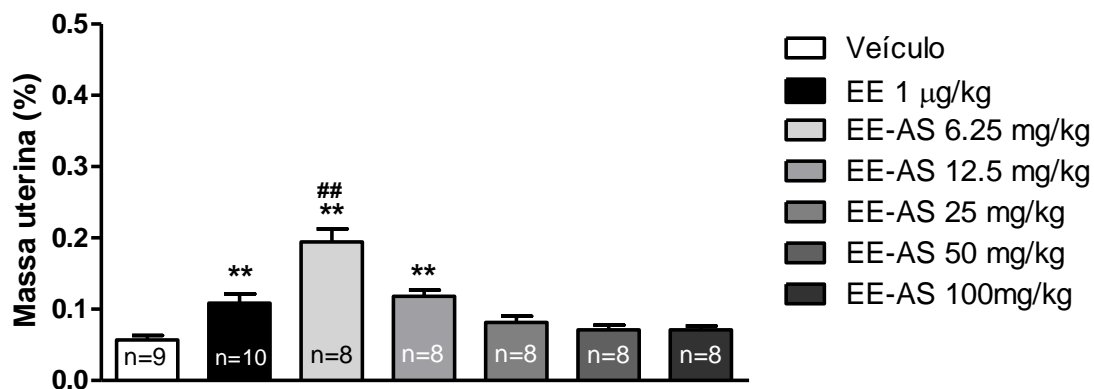


Identificação dos grupos: Veículo (óleo de canola, 5 mL/kg, v.o.), EE (17 α -etinilestradiol 1 µg/kg/5 mL, v.o.), AS = artesunato nas doses indicadas. Cada coluna representa média \pm EPM (Erro Padrão da Média) da massa relativa dos úteros (%). O número de animais de cada grupo está apresentado dentro de cada coluna. Nível de significância ** $p < 0,01$ comparado com veículo, baseado no teste ANOVA de uma via seguido por Bonferroni.

7.2. TESTE DE ANTIESTROGENICIDADE POR VIAS DE ADMINISTRAÇÃO ORAL E SUBCUTÂNEA DO ESTRADIOL

Para investigar os efeitos antiestrogênicos do artesunato, os animais foram tratados com estradiol (1 µg/kg, v.o.) associado ao artesunato (6,25 – 100 mg/kg). Foi encontrado um aumento da massa uterina nas doses de 6,25 e 12,5 mg/kg em relação ao veículo como mostrado na FIGURA 7. Na menor dose de artesunato houve diferença tanto em comparação ao veículo quanto em comparação ao estradiol. Na associação das demais doses (25, 50 e 100 mg/kg) não houve diferença no aumento da massa uterina em relação ao estradiol, no entanto também não houve diferença em relação ao veículo.

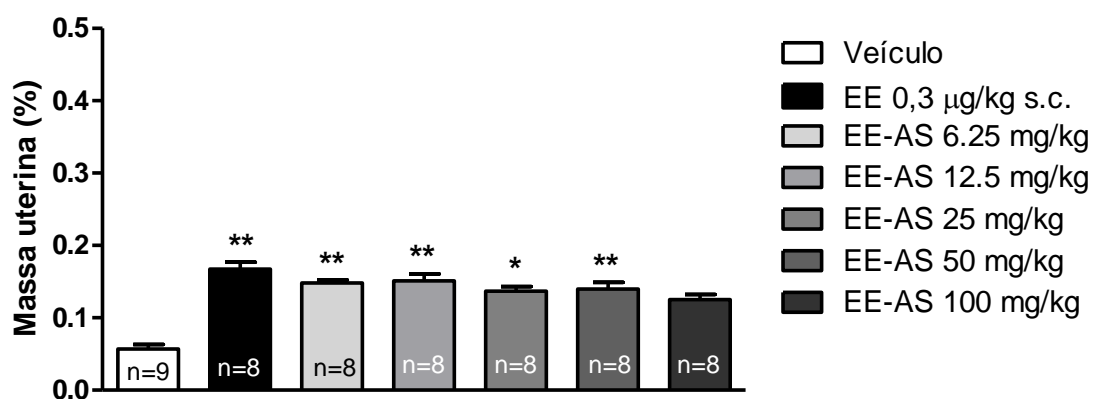
FIGURA 7 MASSA RELATIVA DO ÚTERO VAZIO DOS GRUPOS TRATADOS COM ESTRADIOL ORAL ASSOCIADO AO ARTESUNATO ORAL.



Identificação dos grupos: Veículo (óleo de canola, 5 mL/kg, v.o.), EE (17 α -etinilestradiol 1 µg/kg/5 mL, v.o.), EE-AS = grupos que receberam estradiol e artesunato nas doses indicadas. Cada coluna representa média \pm EPM da massa relativa dos úteros (%). O número de animais de cada grupo está apresentado dentro de cada coluna. Nível de significância ** p < 0,01 comparado com veículo; ## p < 0,01 comparado com estradiol, baseado no teste ANOVA de uma via seguido por Bonferroni.

O teste uterotrófico também foi realizado associando todas as doses do artesunato com estradiol subcutâneo na dose de 0,3 µg/kg, conforme apresentado na FIGURA 8. Neste teste não foi observado efeito estrogênico ou antiestrogênico em qualquer grupo. Todos os animais apresentaram aumento na massa do útero semelhante ao estradiol. No entanto, no grupo tratado com estradiol associado na dose de 100 mg/kg de artesunato, a massa do útero não diferiu significativamente do grupo veículo.

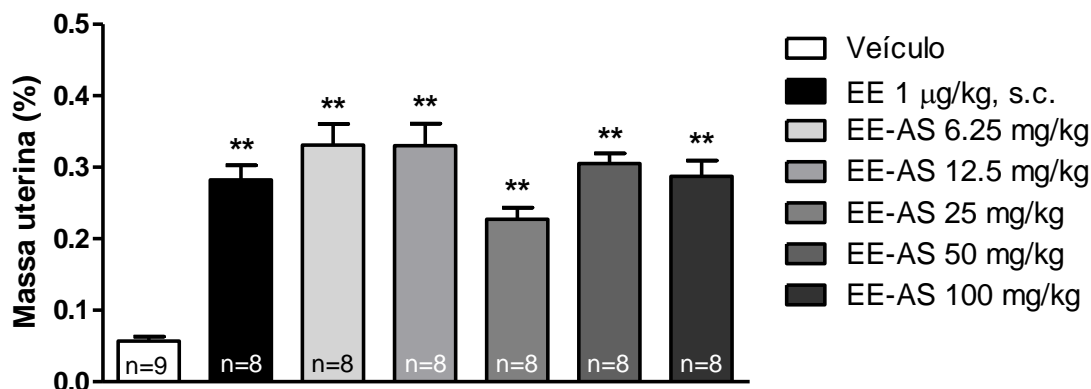
FIGURA 8 MASSA RELATIVA DO ÚTERO VAZIO DOS GRUPOS TRATADOS COM ESTRADIOL SUBCUTÂNEO ASSOCIADO AO ARTESUNATO ORAL.



Identificação dos grupos: Veículo (óleo de canola, 5 mL/kg), EE (17 α -etinilestradiol 0,3 µg/kg/5 mL, s.c.), EE-AS = grupos que receberam estradiol e artesunato nas doses indicadas. As colunas representam média \pm EPM da massa relativa dos úteros (%). O número de animais por grupo está apresentado dentro de cada coluna. Nível de significância * p < 0,05; ** p < 0,01 comparado com veículo, baseado no teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

Na FIGURA 9, é possível observar que o aumento da massa relativa dos úteros dos grupos tratados com estradiol associados ao artesunato foram semelhantes ao grupo de animais que recebeu estradiol na dose de 1 µg/kg, por via subcutânea. Todos os grupos tratados foram diferentes do grupo veículo.

FIGURA 9 MASSA RELATIVA DO ÚTERO VAZIO DOS GRUPOS TRATADOS COM ESTRADIOL SUBCUTÂNEO ASSOCIADO AO ARTESUNATO ORAL

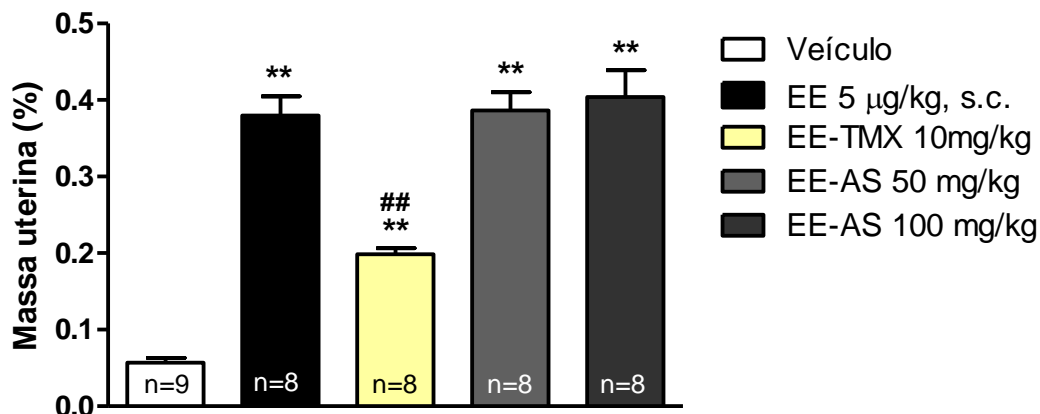


Identificação dos grupos: Veículo (óleo de canola, 5 mL/kg), EE (17α-etinilestradiol 1µg/kg/5 mL, s.c.), EE-AS = grupos que receberam estradiol e artesunato nas doses indicadas. As colunas representam média ± EPM da massa relativa dos úteros (%). O número de animais por grupo está apresentado dentro de cada coluna. Nível de significância ** p < 0,01 comparado com veículo, baseado no teste ANOVA de uma via seguido por Bonferroni.

7.3. TESTE DE ANTAGONISMO DOS RECEPTORES ESTROGÊNICOS UTERINOS

Foi investigado se o artesunato nas doses de 50 e 100 mg/kg apresentaria efeito antagonista dos receptores estrogênicos uterinos. Para isso se realizou um novo teste uterotrófico com estradiol na dose de 5 µg/kg por via subcutânea. Como controle positivo para antiestrogenicidade foi utilizado o tamoxifeno (10 mg/kg, v.o.) associado ao estradiol. Os resultados estão apresentados na FIGURA 10 e demonstram que o tamoxifeno se comportou como um antagonista dos receptores estrogênicos, conforme esperado, mas as doses testadas de artesunato não apresentaram antagonismo quando associadas com uma dose máxima de estradiol.

FIGURA 10 MASSA RELATIVA DO ÚTERO VAZIO DOS GRUPOS TRATADOS COM ESTRADIOL ASSOCIADO AO TAMOXIFENO OU ARTESUNATO ORAL.

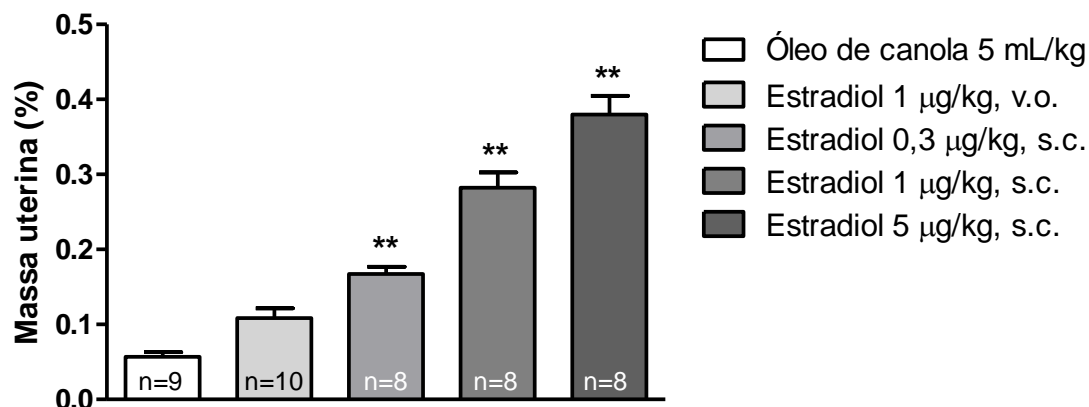


Identificação dos grupos: Veículo (óleo de canola, 5 mL/kg), EE (17 α -etinilestradiol 5 μ g/kg, s.c.), EE-TMX = grupo que recebeu estradiol associado ao tamoxifeno (10 mg/kg, v.o.). EE-AS = grupos que receberam estradiol e artesunato nas doses indicadas. As colunas representam média \pm EPM da massa relativa dos úteros (%). O número de animais por grupo está apresentado dentro de cada coluna. Nível de significância ** p < 0,01 comparado com veículo; ## p < 0,01 comparado com estradiol, baseado no teste ANOVA de uma via seguido por Bonferroni.

7.4. EFEITOS DO ESTRADIOL SOBRE A MASSA UTERINA

A fim de avaliar o efeito estrogênico do estradiol sobre a massa uterina, comparou-se a massa do útero dos animais expostos ao estradiol (1 μ g/kg) por via oral com o estradiol administrado por via subcutânea (0,3; 1 e 5 μ g/kg). Os resultados estão apresentados na FIGURA 11, onde é possível verificar que, quando comparada com as doses aplicadas por via subcutânea, a dose oral não apresenta diferença significativa em relação ao veículo. Além disso, as doses que apresentam 50% do efeito estrogênico (1 e 0,3 μ g/kg, v.o. e s.c. respectivamente) tiverem respostas uterotróficas diferentes entre si.

FIGURA 11 MASSA RELATIVA DO ÚTERO VAZIO DOS GRUPOS TRATADOS COM ESTRADIOL.



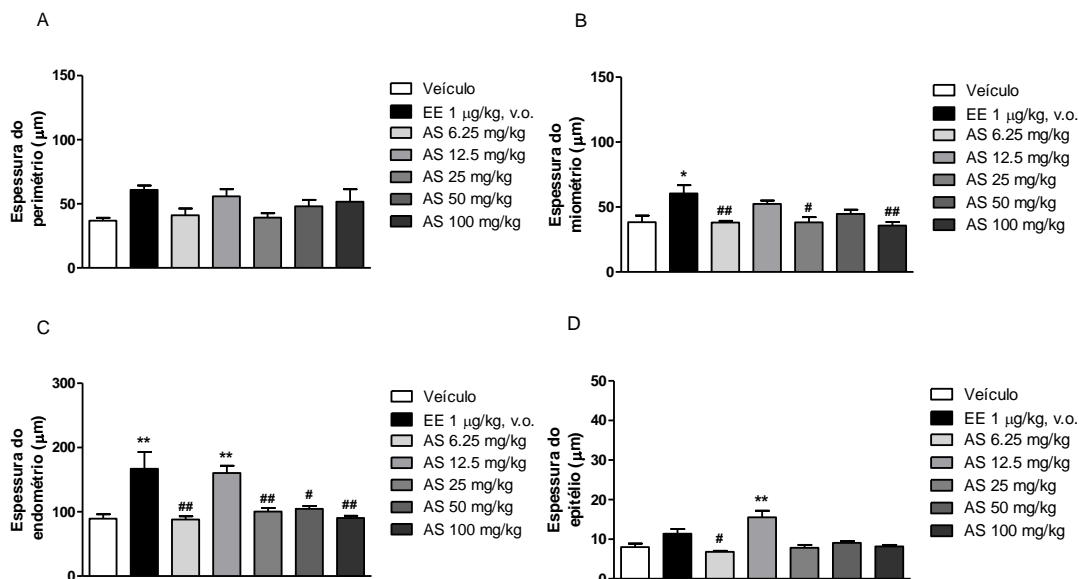
Identificação dos grupos: Veículo (óleo de canola, 5 mL/kg), estradiol oral na dose de 1 µg/kg e por via subcutânea nas doses de 0,3; 1 e 5 µg/kg. As colunas representam média ± EPM da massa relativa dos úteros (%). O número de animais por grupo está apresentado dentro de cada coluna. Nível de significância ** $p < 0,01$ comparado com veículo, baseado no teste ANOVA de uma via seguido por Bonferroni.

7.5. HISTOMORFOMETRIA

7.5.1. Histomorfometria dos grupos tratados com artesunato isolado

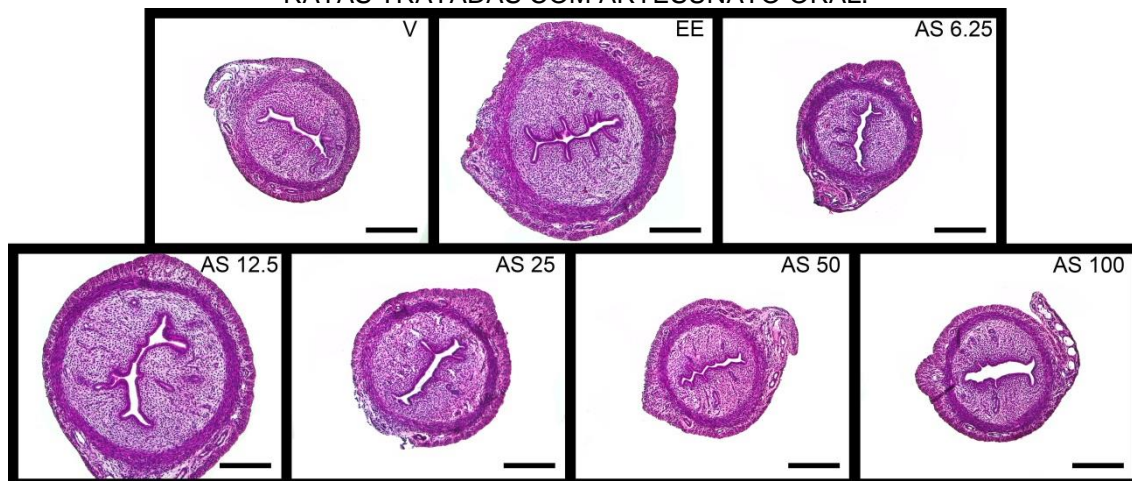
Os resultados histomorfométricos das camadas uterinas estão demonstrados nas FIGURAS 12 E 13. O perimétrio, apresentado na FIGURA 12A, não demonstrou alteração em nenhum dos grupos testados, conforme esperado. Na FIGURA 12B é possível observar que somente o grupo estradiol (1 µg/kg, v.o.) apresentou aumento da espessura do miométrio em relação ao veículo. É notado na FIGURA 12C que os valores médios do endométrio foram maiores nos grupos tratados com estradiol e artesunato isolado na dose de 12,5 mg/kg em relação ao grupo veículo. Os demais grupos tratados com artesunato não mostraram alterações significativas em comparação ao veículo. A espessura do epitélio endometrial, apresentado na FIGURA 12D, mostrou-se aumentada apenas no grupo tratado com artesunato na dose de 12.5 mg/kg.

FIGURA 12 ESPESSURA DAS CAMADAS UTERINAS DO TRATAMENTO COM ARTESUNATO ISOLADO ORAL.



Identificação dos grupos: Veículo (óleo de canola, 5 mL/kg), EE (17 α -etinilestradiol 1 μ g/kg, v.o.), AS = grupos que receberam artesanato nas doses indicadas. Figura 12A apresenta a espessura do perimétrio. A espessura do miométrio é apresentada na Figura 12B, o endométrio é demonstrado na Figura 12C, e o epitélio na Figura 12D. As colunas representam média \pm EPM. O número de animais por grupo foi cinco. Nível de significância * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado com veículo; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ comparado com estradiol, baseado no teste ANOVA de uma via seguido por Bonferroni.

FIGURA 13 CORTES HISTOLÓGICOS REPRESENTATIVOS DOS CORNOS UTERINOS DE RATAS TRATADAS COM ARTESUNATO ORAL.



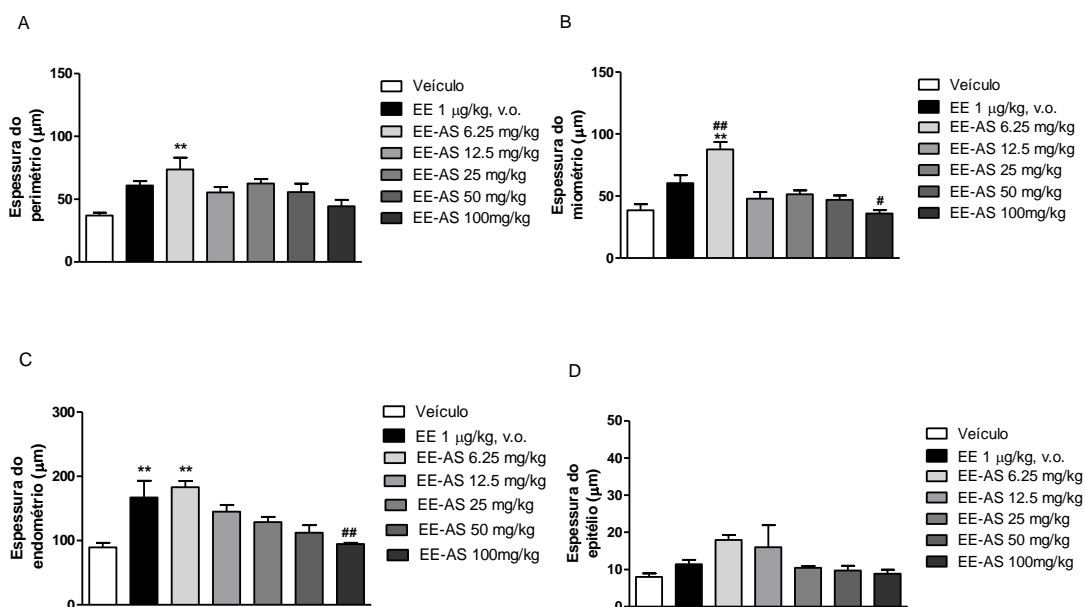
Identificação dos grupos: V = veículo (óleo de canola, 5 mL/kg); EE = 17 α -etinilestradiol (1 μ g/kg, v.o.); AS = artesanato nas doses indicadas. A barra de escala representa 200 μ m (HE, 100x).

7.5.2. Histomorfometria dos grupos tratados com estradiol oral associado ao artesanato

Quando o artesanato foi administrado em combinação com estradiol oral houve um aumento significativo do perimétrio (FIGURA 14A), miométrio (FIGURA 14B), e endométrio (FIGURA 14C) observado no grupo tratado com estradiol associado ao artesanato na dose de 6.25 mg/kg. O tratamento com

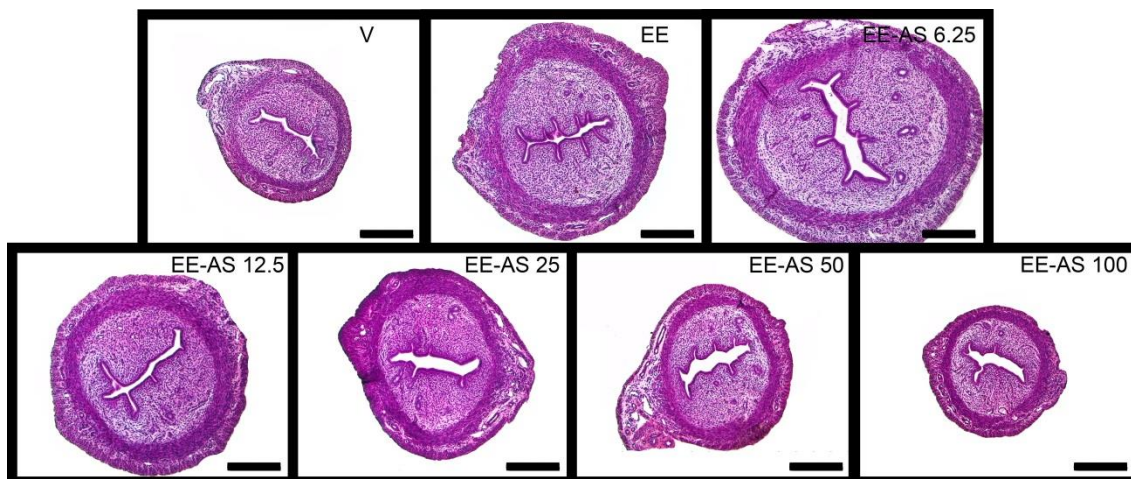
estradiol aumentou a espessura do endométrio (FIGURA 14C). Além disso, houve uma redução progressiva das camadas uterinas nos grupos tratados com as demais doses de artesunato (12,5 a 50 mg/kg), porém somente o grupo tratado com estradiol associado ao artesunato na dose de 100 mg/kg foi significativamente menor que o grupo tratado com estradiol (FIGURA 14B E 14C). Nenhum dos grupos tratados demonstraram diferenças no aumento do epitélio (FIGURA 14D). Estes achados estão apresentados também na FIGURA 15.

FIGURA 14 ESPESSURA DAS CAMADAS UTERINAS DO TRATAMENTO COM ESTRADIOL ORAL ASSOCIADO AO ARTESUNATO ORAL.



Identificação dos grupos: Veículo (óleo de canola, 5 mL/kg), EE (17 α -etinilestradiol 1 µg/kg, v.o.), EE-AS = grupos que receberam EE e AS nas doses indicadas. Figura 14A apresenta a espessura do perimétrio. A espessura do miométrio é apresentada na Figura 14B, o endométrio é demonstrado na Figura 14C, e o epitélio na Figura 14D. As colunas correspondem a média \pm EPM. O número de animais por grupo foi cinco. Nível de significância ** $p < 0,01$ comparado com veículo; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ comparado com estradiol, baseado no teste ANOVA de uma via seguido por Bonferroni.

FIGURA 15 CORTES HISTOLÓGICOS REPRESENTATIVOS DOS CORNOS UTERINOS DE RATAS TRATADAS COM ESTRADIOL ORAL ASSOCIADO AO ARTESUNATO ORAL.

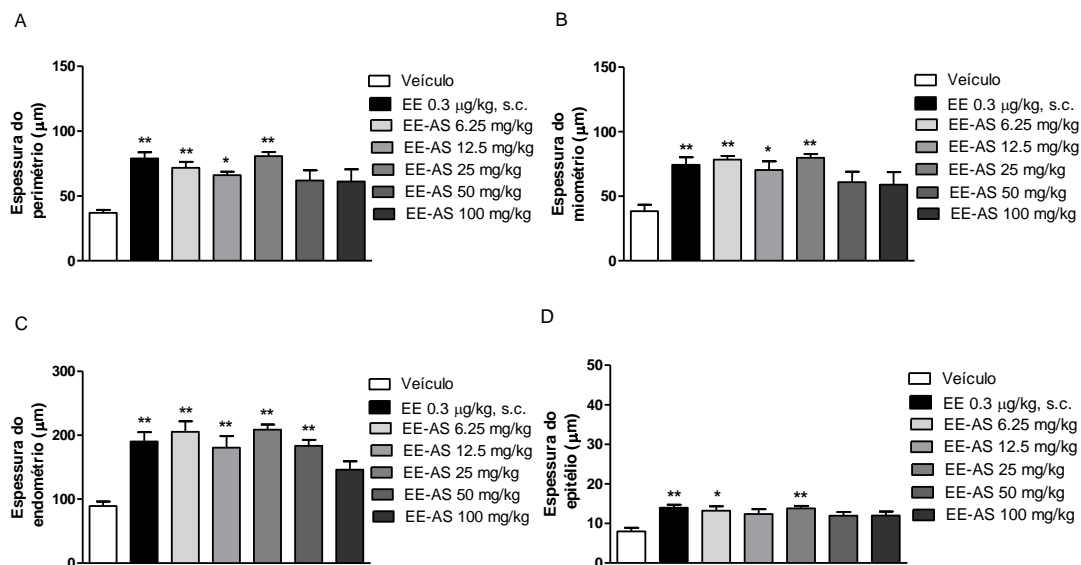


Identificação dos grupos: V = veículo (óleo de canola, 5 mL/kg); EE = 17 α -etinilestradiol (1 μ g/kg, v.o.); EE-AS = grupos que receberam EE e AS nas doses indicadas. A barra de escala representa 200 μ m (HE, 100x).

7.5.3. Histomorfometria dos grupos tratados com estradiol subcutâneo associado ao artesunato

A combinação de estradiol (0,3 μ g/kg, s.c.) e artesunato nas doses de 6,25; 12,5; 25 mg/kg apresentaram um aumento significativo do perimétrio, miométrio e endométrio, em relação ao veículo, assim como o grupo estradiol (FIGURA 16A, 16B e 16C). O grupo tratado com estradiol associado ao artesunato na dose de 50 mg/kg teve aumento significativo apenas da espessura endometrial (FIGURA 16C). O epitélio apresentou espessura aumentada significativamente apenas nos grupos tratados com estradiol associado com artesunato nas doses de 6.25 e 25 mg/kg (FIGURA 16D). O grupo tratado com estradiol associado ao artesunato na dose de 100 mg/kg não teve nenhuma das camadas uterinas aumentadas de maneira significativa em relação ao veículo. A FIGURA 17 representa a histologia dos grupos acima descritos.

FIGURA 16 ESPESSURA DAS CAMADAS UTERINAS DO TRATAMENTO COM ESTRADIOL SUBCUTÂNEO ASSOCIADO AO ARTESUNATO ORAL.



Identificação dos grupos: Veículo (óleo de canola, 5 mL/kg), EE (17α -etinilestradiol 0,3 µg/kg/5 mL, s.c.), EE-AS = grupos que receberam EE e AS nas doses indicadas. Figura 16A apresenta a espessura do perímério. A espessura do miométrio é apresentada na Figura 16B, o endométrio é demonstrado na Figura 16C, e o epitélio na Figura 16D. As colunas representam média \pm EPM. O número de animais por grupo foi cinco. Nível de significância * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ comparado com veículo, baseado no teste ANOVA de uma via seguido por Bonferroni.

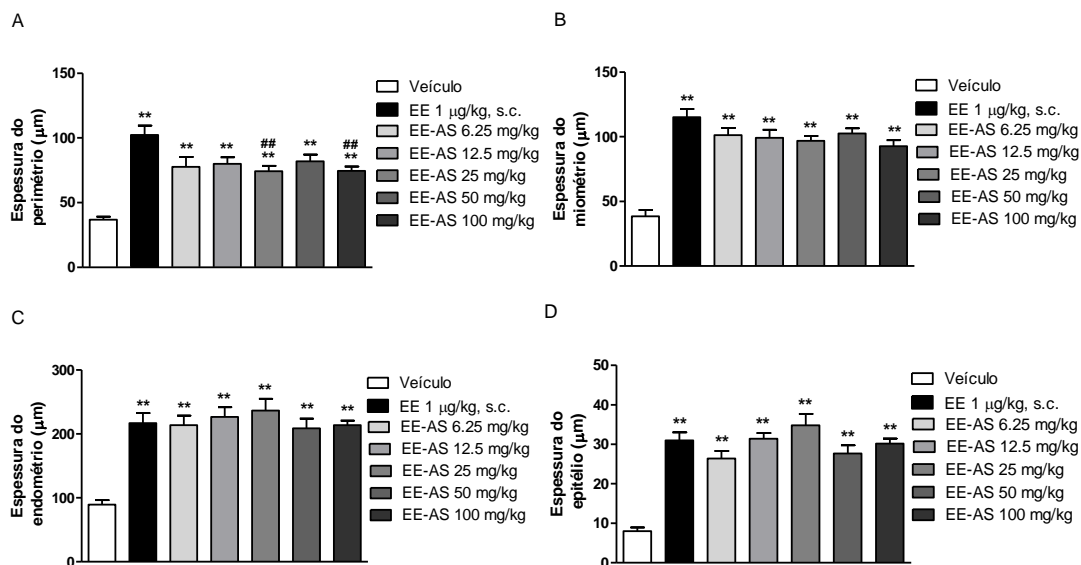
FIGURA 17 CORTES HISTOLÓGICOS REPRESENTATIVOS DOS CORNOS UTERINOS DE RATAS TRATADAS COM ESTRADIOL SUBCUTÂNEO ASSOCIADO AO ARTESUNATO ORAL.



Identificação dos grupos: V = veículo (óleo de canola, 5 mL/kg); EE = 17α -etinilestradiol (0,3 µg/kg, s.c.); EE-AS = grupos que receberam EE e AS nas doses indicadas. A barra de escala representa 200 µm (HE, 100x).

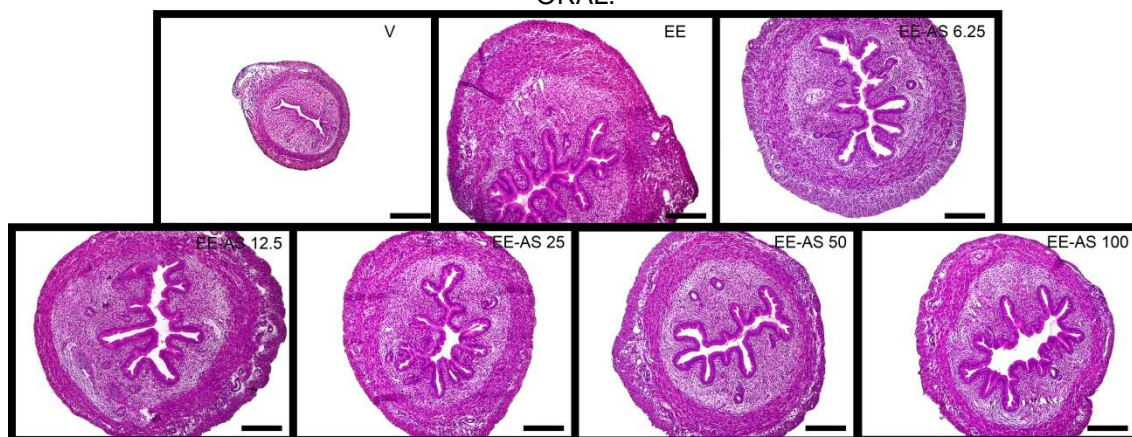
Os grupos tratados com estradiol (1 µg/kg, s.c.) e a associação com artesunato em todas as doses indicadas (FIGURAS 18 e 19) demonstraram aumento uterino em todas as camadas quando comparados com o grupo tratado com veículo.

FIGURA 18 ESPESSURA DAS CAMADAS UTERINAS DO TRATAMENTO COM ESTRADIOL SUBCUTÂNEO ASSOCIADO AO ARTESUNATO ORAL.



Identificação dos grupos: Veículo (óleo de canola, 5 mL/kg), EE (17 α -etinilestradiol 1 μ g/kg/5 mL, s.c.), EE-AS = grupos que receberam EE e AS nas doses indicadas. Figura 18A apresenta a espessura do perimétrio. A espessura do miométrio é apresentada na Figura 18B, o endométrio é demonstrado na Figura 18C, e o epitélio na Figura 18D. As colunas correspondem a média \pm EPM. O número de animais por grupo foi cinco. Nível de significância ** $p < 0,01$ comparado com veículo, ## $p < 0,01$ comparado com estradiol baseado no teste ANOVA de uma via seguido por Bonferroni.

FIGURA 19 CORTES HISTOLÓGICOS REPRESENTATIVOS DOS CORNOS UTERINOS DE RATAS TRATADAS COM ESTRADIOL SUBCUTÂNEO ASSOCIADO AO ARTESUNATO ORAL.



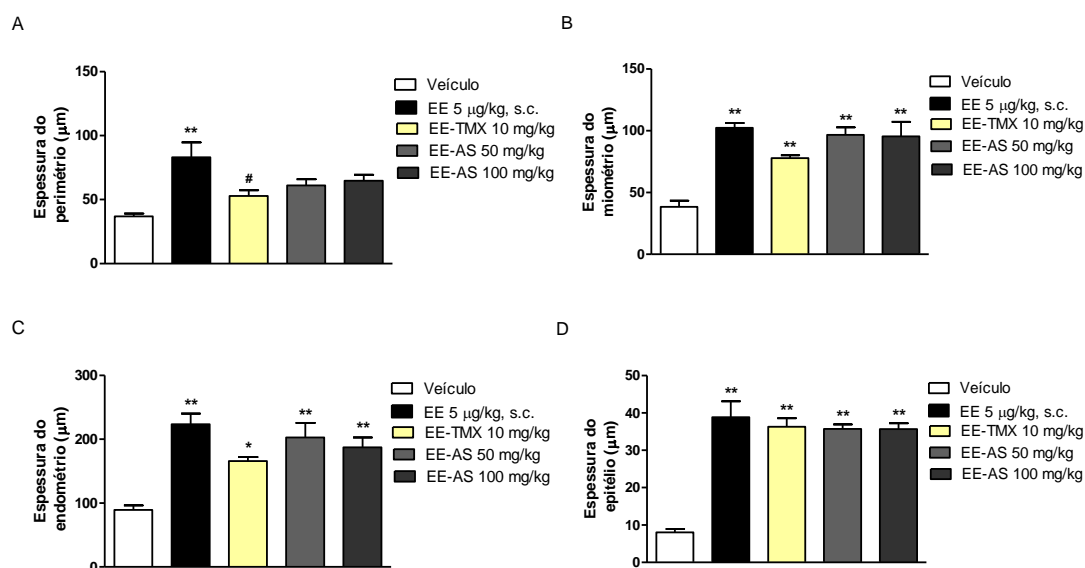
Identificação dos grupos: V = veículo (óleo de canola, 5 mL/kg); EE = 17 α -etinilestradiol (1 μ g/kg, s.c.); EE-AS = grupos que receberam EE e AS nas doses indicadas. A barra de escala representa 200 μ m (HE, 100x).

7.5.4. Histomorfometria dos grupos tratados com estradiol subcutâneo associado ao tamoxifeno e artesunato

Os resultados da histomorfometria dos grupos tratados com estradiol (5 μ g/kg, s.c.), associado ao tamoxifeno e ao artesunato nas doses 50 e 100 mg/kg estão apresentados nas FIGURAS 20 e 21. O perimétrio apresentou aumento

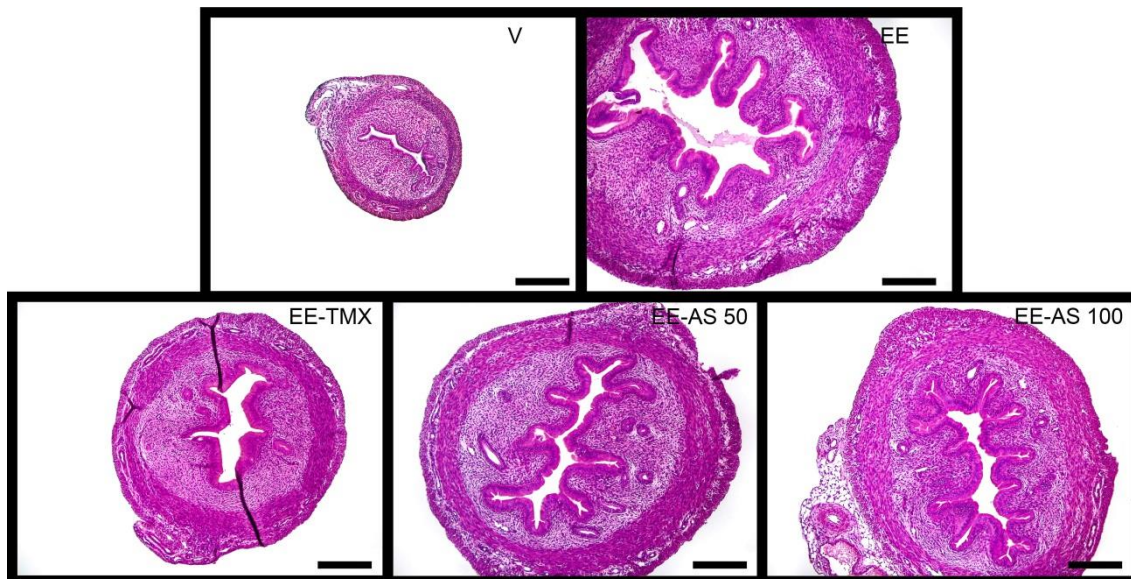
apenas no grupo tratado com estradiol (FIGURA 20A). Nas FIGURAS 20B, 20C e 20D é possível observar que houve aumento do miométrio, endométrio e epitélio respectivamente de todos os grupos tratados em relação ao veículo. Além disso, é notável a tendência a redução das camadas uterinas do grupo tratado com estradiol associado ao tamoxifeno, evidenciada no endométrio (FIGURA 20C).

FIGURA 20 ESPESSURA DAS CAMADAS UTERINAS DO TRATAMENTO COM ESTRADIOL SUBCUTÂNEO ASSOCIADO AO TAMOXIFENO E ARTESUNATO ORAL.



Identificação dos grupos: Veículo (óleo de canola, 5 mL/kg), EE (17 α -etinilestradiol 5 µg/kg, s.c.), EE-TMX = grupo que recebeu EE e TMX nas doses indicadas; EE-AS = grupos que receberam EE e AS nas doses indicadas. Figura 20A apresenta a espessura do perimetrio. A espessura do miométrio é apresentada na Figura 20B, o endométrio é demonstrado na Figura 20C, e o epitélio na Figura 20D. As colunas representam média \pm EPM. O número de animais por grupo foi cinco. Nível de significância * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado com veículo; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ comparado com estradiol, baseado no teste ANOVA de uma via seguido por Bonferroni.

FIGURA 21 CORTES HISTOLÓGICOS REPRESENTATIVOS DOS CORNOS UTERINOS DE RATAS TRATADAS COM ESTRADIOL SUBCUTÂNEO ASSOCIADO AO TAMOXIFENO E ARTESUNATO ORAL.



Identificação dos grupos: V = veículo (óleo de canola, 5 mL/kg); EE = 17 α -etinilestradiol (5 μ g/kg, s.c.); EE-TMX = grupo que recebeu EE e TMX nas doses indicadas EE-AS = grupos que receberam EE e AS nas doses indicadas. A barra de escala representa 200 μ m (HE, 100x).

8. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que o artesunato apresentou efeito estrogênico. Além disso, o fármaco também potencializou a atividade estrogênica do estradiol sobre a massa uterina, quando o estradiol foi administrado em baixa dose. No entanto, a associação de artesunato com maiores doses de estradiol, não promoveu potencialização da atividade estrogênica. Estes resultados sugerem que o artesunato exerça efeito modulador da atividade estrogênica dependente da relação estrogênio/receptor. Não existe na literatura qualquer dado que demonstre a atividade estrogênica e moduladora estrogênica do artesunato, intensificando a importância dos resultados deste trabalho.

O artesunato aumentou a massa uterina quando administrado na dose de 12,5 mg/kg. Além disso, na análise histomorfométrica, o artesunato aumentou a espessura do endométrio e epitélio endometrial, que são camadas uterinas suscetíveis à ação de estrogênios (HAPANGAMA, KAMAL e BULMER, 2015; KITAJIMA, et al., 2004). Estes resultados sugerem que o artesunato tenha atividade estrogênica. Entretanto, as demais doses não apresentaram qualquer efeito estrogênico. Na toxicologia, alguns compostos apresentam efeitos horméticos, que são fenômenos dose-resposta bifásicos, caracterizados por efeitos opostos em doses diferentes (CALABRESE, 2002). No entanto, para

caracterizar a possível existência de efeitos bifásicos do artesunato, doses intermediárias devem ser testadas.

Um dos possíveis modos de ação do artesunato é diretamente sobre os receptores estrogênicos presentes no útero. Os receptores estrogênicos pertencem a família de receptores nucleares e agem através de fatores de transcrição ativados por ligantes (O'MALLEY, 2005). Dentre as duas isoformas dos receptores estrogênicos no útero (RE α e RE β) o RE α é o principal responsável pela proliferação endometrial (BROSENS, et al., 2004; HAPANGAMA, KAMAL e BULMER, 2015). O aumento na espessura do endométrio e epitélio sugerem que o artesunato pode estar envolvido com a ação sobre os receptores estrogênicos do tipo alfa.

Os estrogênios podem exercer sua atividade de duas maneiras. No mecanismo clássico de ação, que ocorre mais lentamente, o estrogênio é difundido para dentro da célula e se liga ao receptor estrogênico localizado no núcleo, formando um complexo estrogênio-receptor que se conecta a elementos de resposta estrogênicos. Isso desencadeia uma cascata de reações que resultam na transcrição de genes promovendo resposta fisiológica. O modo de ação não clássico ocorre mais rapidamente, e se dá através de receptores estrogênicos localizados na membrana plasmática e citoplasma, ou através de proteínas de ligação ao estrogênio associada a membrana, que desencadeiam uma série de eventos celulares (DEROO e KORACH, 2006; HAPANGAMA, KAMAL e BULMER, 2015).

A associação do estradiol oral com artesunato demonstrou que em baixas doses o fármaco potencializou a ação uterotrófica do estradiol, enquanto que em altas doses houve uma tendência antiestrogênica reforçada pela análise histomorfométrica dos mesmos grupos, demonstrando redução significativa do miométrio e endométrio na associação de estradiol com artesunato, na dose de 100 mg/kg. A estrogenicidade observada em baixas doses e antiestrogenicidade em altas doses sugerem que o artesunato exerça ação modulatória estrogênica.

O teste uterotrófico é um ensaio padrão para detecção de substâncias estrogênicas através do aumento da massa uterina (OECD, 2007). Este ensaio também pode ser usado para verificação de antiestrogenicidade, que é visualizada quando uma substância teste é administrada em combinação com estradiol e apresenta redução do peso uterino. No entanto, é possível que a

associação de estradiol a outras substâncias promovam uma potencialização do efeito estrogênico, como foi observado na associação de estradiol oral e artesunato descrito no parágrafo anterior.

A administração de estradiol combinada com artesunato, ambos por via oral, apresentou potencialização estrogênica (em baixas doses de artesunato) e uma tendência a antiestrogenicidade (em altas doses). Este resultado corrobora achados *in vitro* realizados pelo nosso grupo de pesquisa (dados não publicados), onde o artesunato apresentou uma atividade moduladora dos efeitos do estradiol sobre receptores estrogênicos alfa. Desse modo, o artesunato pode vir a ser uma importante alternativa no tratamento de doenças estrogênio-dependentes, como o câncer de mama e câncer endometrial. A artemisinina já foi testada nesse sentido e demonstrou redução da expressão de receptores estrogênicos alfa em células de câncer de mama MCF-7, bloqueando proliferação celular estimulada pelo estradiol (SUNDAR, et al., 2008).

A potencialização estrogênica não foi observada quando a via de administração do estradiol foi alterada (de via oral para via subcutânea), sugerindo que alguma interação farmacocinética pudesse estar envolvida com esse efeito observado por via oral.

O 17 α -etinilestradiol é um potente estrogênio sintético lipossolúvel, obtido a partir de reações de alquilação ou esterificação de hormônios naturais. É rapidamente absorvido pelo organismo e é amplamente ligado a proteínas plasmáticas (GUISELLI e JARDIM, 2007). É muito utilizado como contraceptivo oral e recomendado como controle positivo para estrogenicidade (OECD, 2007). No teste uterotrófico o 17 α -etinilestradiol é indicado por ser um agonista estrogênico potente, exibindo efeitos em menores doses que o 17 β -estradiol (BOLT, 1979; CLODE, 2006).

O artesunato é o derivado da artemisinina solúvel em água e quando administrado por via oral é rapidamente absorvido, porém de forma incompleta. A biodisponibilidade oral dos derivados da artemisinina em animais é baixa (19 a 35%). O artesunato é instável em pH gástrico. A sua distribuição nos tecidos é alta, sendo encontrado em ordem decrescente no intestino, encéfalo, fígado, rim, testículo, músculo, gordura, coração, soro, globo ocular, baço e pulmão. Com exceção do encéfalo, soro, intestino e gordura, após uma hora da administração, as concentrações nos tecidos caem significativamente. O artesunato e a

dihidroartemisinina têm uma alta capacidade de ligação a proteínas plasmáticas (73-81% e 93% respectivamente) (GAUTAM, et al., 2009). A albumina é importante para uma série de processos fisiológicos com ligação e distribuição de aminoácidos, ácidos graxos, porfirinas, bilirrubina, esteroides, e também é relevante no transporte de fármacos, interferindo na distribuição, metabolismo e eliminação dos mesmos (BIAN, et al., 2006).

Uma das probabilidades de interação farmacocinética é que durante a absorção do artesunato, o pH do estômago tenha se modificado pela administração prévia de estradiol (dissolvido em óleo de canola), uma vez que a ingestão de gordura retarda a secreção ácida (BROOKS, 1985) permitindo que uma maior quantidade de artesunato fosse absorvido. Apesar da possibilidade de que o artesunato pudesse ter sido mais bem absorvido quando associado ao estradiol por via oral, e que ao competir com artesunato e dihidroartemisinina pela ligação a proteínas plasmática, o estradiol ficaria em maior quantidade na forma livre, aumentando os efeitos estrogênicos observados. Essa hipótese não explicaria a ausência dos efeitos nas demais doses de artesunato associadas ao estradiol. Além do que, em humanos, a administração da combinação artesunato-amodiaquina foi verificada em jejum e após alimentação rica em gordura. Observou-se que a concentração plasmática do artesunato foi diminuída no estado alimentado. Este estudo sugere que a ingestão dessa combinação seja realizada em jejum (FITOUSSI, et al., 2009).

Como pode ser visualizado na FIGURA 11, a dose de estradiol de 1 µg/kg administrada por via oral, perdeu a sua significância quando comparada ao veículo, enquanto que as demais doses de estradiol mantiveram o aumento uterino significativo, pressupondo que as modificações na resposta estrogênica do estradiol promovidas pelo artesunato possam estar principalmente relacionadas com baixas doses de estradiol. É possível que quando associado com baixas doses de estradiol, o artesunato promova uma intensificação na ligação entre estradiol e receptor, potencializando a ação estrogênica. Essa ação talvez não seja evidenciada quando a dose de estradiol é aumentada, pois ocorre a saturação dos receptores quando há mais estradiol disponível, de modo que o efeito potencializador do artesunato não seja observado. Esse achado pode ser bastante significativo na clínica, uma vez que muitas mulheres fazem uso de contraceptivos orais, que por sua vez possuem baixas doses de etinilestradiol

(20-35 µg) (STOKER, GIBSON e ZORRILLA, 2010) Além disso, o antibacteriano Triclosan já demonstrou efeito potencializador estrogênico, independente da ativação de receptores estrogênicos, quando associado a baixas doses de estradiol no teste uterotrófico (LOUIS, HALLINGER e STOKER, 2013).

Ao comparar as doses e vias do estradiol dos testes uterotróficos é possível observar que apesar das doses de estradiol usadas por via oral e subcutânea (1µg/kg, v.o. e 0,3 µg/kg, s.c.) terem sido validadas e recomendadas pela OECD (KANNO, et al., 2001), elas não apresentaram um aumento uterino similar, como esperado. A curva dose-resposta de estradiol por via oral já foi padronizada em nosso laboratório e pode ser visualizada no ANEXO 1. No entanto, é necessário que o mesmo seja feito para a via subcutânea, para que haja compatibilidade dos resultados com as nossas condições de trabalho.

Diferente do que se esperava, o artesunato nas doses de 50 e 100 mg/kg associados ao estradiol (5 µg/kg, s.c.) não apresentou efeito antiestrogênico e antagonista dos receptores estrogênicos, enquanto que o grupo de animais tratados com estradiol combinado ao tamoxifeno reduziu a massa uterina e apresentou uma tendência na diminuição da espessura das camadas da parede do órgão. O tamoxifeno é um modulador seletivo dos receptores estrogênicos que quando associado a baixas doses de estradiol, age como um agonista parcial; e quando combinado a altas doses de estradiol exerce ação de antagonista dos receptores estrogênicos (FONG, et al., 2010).

Em resumo, este trabalho demonstrou que o artesunato apresentou atividade estrogênica no útero e modulou o efeito estrogênico do estradiol por via oral em baixa dose, corroborando dados *in vitro* ainda não publicados do nosso grupo. No entanto esta modulação não é verificada quando o estradiol é administrado por via subcutânea nas maiores doses testadas, sugerindo interação farmacocinética ou farmacodinâmica. O antagonismo do artesunato nas maiores doses testadas, associado ao estradiol e comparado ao tamoxifeno não foi identificado. Estes resultados sugerem que o artesunato tenha atividade estrogênica e que ele module a resposta estrogênica de baixas doses de estradiol, quando associado por via oral.

9. CONCLUSÃO

Com este trabalho se pode concluir que:

- O antimalárico artesunato apresentou atividade estrogênica *in vivo* através do teste uterotrófico em ratas imaturas na dose de 12,5 mg/kg.
- O artesunato demonstrou modulação da atividade estrogênica do estradiol por via oral.
- O artesunato não demonstrou antagonismo dos receptores estrogênicos presentes no útero.
- A avaliação histomorfométrica das camadas uterinas de ratas tratadas com artesunato isolado e combinado com estradiol (v.o. e s.c.) foi coerente com os dados dos testes uterotróficos.

Os resultados deste trabalho são relevantes do ponto de vista toxicológico, principalmente para mulheres em idade reprodutiva, uma vez que o artesunato apresentou efeito modulador estrogênico, podendo funcionar como uma alternativa na terapia de doenças estrogênio-dependente, bem como uma substância desreguladora endócrino.

REFERÊNCIAS

- ABOLAJI, A O, et al. 2013. A safety assessment of the antimalarial herb *Artemisia annua* during pregnancy in Wistar rats. **Phytotherapy Research**. v. 27, p. 647–654.
- ABOLAJI, A O, et al. 2014. *Artemisia annua* as a possible contraceptive agent: a clue from mammalian rat model. **Natural Product Research**. v. 24, p. 2342-2346.
- AGTMAEL, M A VAN, EGELTE, T A e VAN BOXTEL, C J. 1999. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 20, p. 199-205.
- AGUIAR, A C C, et al. 2012. New approaches in antimalarial drug discovery and development - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 107, p. 831-845.
- AVERY, M A, et al. 2002. Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 7. Direct modification of (+)-artemisinin in vivo antimalarial screening of new, potential preclinical antimalarial candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, p. 4321-4335.
- BALINT, G A. 2001. Artemisinin and its derivatives - An important new class of antimalarial agents. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 90, p. 261-265.
- BECKER, R A, et al. 2014. Interpreting estrogen screening assays in the context of potency and human exposure relative to natural exposures to phytoestrogens. **Birth Defects Research (Part B)**. v. 101, p. 114-124.
- BENJAMIM, J M, et al. 2015. Population pharmacokinetics, tolerability, and safety of dihydroartemisinin-piperaquine and sulfadoxine-pyrimethamine-piperaquine in pregnant and nonpregnant Papua New Guinean women. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 59, p. 4260-4271.
- BIAN, H, et al. 2006. Study of the interaction of artemisinin with bovine serum albumin. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 39, p. 291-297.
- BOARETO, A C, et al. 2008. Toxicity of artemisinin [*Artemisia annua* L.] in two different periods of pregnancy in Wistar ratS. **Reproductive Toxicology**. v. 25, p. 239-246.
- BOARETO, A C, et al. 2012. Study on the developmental toxicity of combined artesunate and mefloquine antimalarial drugs on rats. **Reproductive Toxicology**. v. 34, p. 658-664.
- BOARETO, A C, et al. 2013. Effects of the combined artesunate and mefloquine antimalarial drugs on rat embryos. **Human Experimental Toxicology**. v. 32, p. 930-941.
- BOLT, H M. 1979. Metabolism of estrogens - naturals and synthetic. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 4, p. 155-181.

- BRASIL. 2010. Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil: Série A. Normas e Manuais Técnicos. **Ministério da Saúde**. Brasília : Secretaria de Vigilância e Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica.
- BRASIL. 2014. Malária: Descrição da Doença. [Portal da Saúde] Brasília : **Ministério da Saúde**.
- BRASIL. 2016. Malária. [Portal da Saúde] Brasília : **Ministério da Saúde**.
- BREITHAUPT, H. 2004. A cause without a disease. **EMBO Reports**. v. 1, p. 16-18.
- BROOKS, F P. 1985. Effect of diet on gastric secretion. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 42, p. 1006-1019.
- BROSENS, J J, et al. 2004. Steroid receptor action. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**. v. 18, p. 265-283.
- BRUCE-CHWATT, L J. 1985. Recent trends of chemotherapy and vaccination against malaria: new lamps for old. **British Medical Journal**. v. 291, p. 1072-1076.
- BURGER, R J, et al. 2016. Artemisinin-Based Combination Therapy Versus Quinine or Other Combinations for Treatment of Uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria in the Second and Third Trimester of Pregnancy: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Open Forum Infectious Diseases**. v. 170.
- CALABRESE, E. 2002. Hormesis: changing of the dose-response, a personal account of the history and current status. **Mutation Research**. v. 511, p. 181-189.
- CDC. 2015. <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/>. **Centers for Disease Control and Prevention**. [Online] U.S. Department of Health and Human Services, 21 de novembro de 2015. [Citado em: 11 de 07 de 2016.]
- CLARK, R L, et al. 2004. Developmental toxicity of artesunate and an artesunate combination in the rat and rabbit. **Birth Defects Research (Part B)**. v. 71, p. 380-394.
- CLARK, R L. 2009. Embryotoxicity of the artemisinin antimalarials and potential consequences for use in women in the first trimester. **Reproductive Toxicology**. v. 3, p. 285-296.
- CLODE, S A. 2006. Assessment of in vivo assays for endocrine disruption. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 20, p. 35-43.
- DEROO, B J e KORACH, K S. 2006. Estrogen receptors and human disease. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 116, p. 561-570.
- DONDORP, A, et al. 2005. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. **The Lancet**. v. 366, p. 717-725.

- DONDORP, A M, et al. 2009. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. **The New England Journal of Medicine**. v. 361, p. 455-497.
- DUFFY, P e MUTABINGWA, T K. 2004. Drug combinations for malaria: time to ACT? **The Lancet**. v. 363, p. 3-4.
- ECKSTEIN-LUDWIG, U, et al. 2003. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. **Nature**. v. 424, p. 957-961.
- EFFERTH, T, et al. 2015. Nobel prize for artemisinin brings phytotherapy into the spotlight. **Phytomedicine**. v. 22, p. A1-A3.
- FAROMBI, E O, et al. 2014. Sperm characteristics, antioxidant status and hormonal profile in rats treated with artemisinin. **Andrologia**. v. 46, p. 893-901.
- FAROMBI, E O, et al. 2015. Artemisinin induces hormonal imbalance and oxidative damage in the erythrocytes and uterus but not in the ovary of rats. **Human & Experimental Toxicology**. v. 34, p. 83-92.
- FERNANDEZ-ÁLVARO, E, et al. 2016. Antimalarial chemotherapy: natural product inspired development of preclinical and clinical candidates with diverse mechanisms of action. **Journal of Medicinal Chemistry**.
- FITOUSSI, S, et al. 2009. Bioavailability of a co-formulated combination of amodiaquine and artesunate under fed and fasted conditions. A randomised, open-label crossover study. **Arzneimittelforschung**. v. 59, p. 370-376.
- FONG, C J, et al. 2010. Effects of tamoxifen and ethynylestradiol cotreatment on uterine gene expression in immatures, ovariectomized mice. **Journal of Molecular Endocrinology**. v. 45, p. 161-173.
- FRANÇA, T C C, DOS SANTOS, M G e FIGUEIROA-VILLAR, J D. 2008. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**. v. 5, p. 1271-1278.
- GAUTAM, A, et al. 2009. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Endoperoxide Antimalarials. **Current Drug Metabolism**. v. 10, p. 289-306.
- GOMES, A P, et al. 2011. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v. 23, p. 358-369.
- GOU, Z. 2016. Artemisinin anti-malarial drugs in China. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. v. 6, p. 115-124.
- GREENWOOD, B e MUTABINGWA, T. 2002. Malaria in 2002. **Nature**. v. 415, p. 670-672.
- GREENWOOD, B M, et al. 2008. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 118, p. 1266-1276.
- GRUBER, C J, et al. 2002. Production and actions of estrogens. **The New England Journal of Medicine**. v. 346, p. 340-352.
- GUISELLI, G e JARDIM, W F. 2007. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**. v. 30, p. 695-706.

- GUSTAFSSON, J A. 2003. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 24, p. 479-485.
- HAFALLA, J C, SILVIE, O e MATUSCHEWSKI, K. 2011. Cell biology and immunology of malaria. **Immunological Reviews**. v. 240, p. 297-316.
- HAMPL, R, KUBATOVA, J e STARKA, L. 2014. Steroids and endocrine disruptors-history, recent state of art and open questions. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v. 155, p. 271-223.
- HANG, H P, et al. 2012. *Farmacologia*. 7ed. s.l. : Elsevier, p. 655-667.
- HAPANGAMA, D K, KAMAL, A M e BULMER, J N. 2015. Estrogen receptor b: the guardian of the endometrium. **Human Reproduction Update**. v. 21, p. 174-193.
- HAYNES, R K e KRISHNA, S. 2004. Artemisinins: activities and actions. **Microbes and Infection**. v. 6, p. 1339-1346.
- HAYNES, R K, et al. 2010. Facile oxidation of leucomethylene blue and dihydroflavins by artemisinins: relationship with flavoenzyme function and antimalarial mechanism of action. **Chem Med Chem**. v. 5, p. 1282-1299.
- HELDRING, N, et al. 2007. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. **Physiological Reviews**. v. 87, p. 905-931.
- HIEN, T T e WHITE, N J. 1993. Qinghaosu. **The Lancet**. v. 341, p. 603-606.
- IPCS. 2002. Global assessment of the state of the science of endocrine disruptors. **International Programme on Chemical Safety**. World Health Organization - WHO.
- JAIN, D C, et al. 1996. Isolation of high artemisinin-yielding clones of *Artemisia annua*. **Phytochemistry**. v. 34, n. 5, p. 993-1001.
- JEWO, P I, et al. 2008. Effects of Short and Medium Term use of Artesunate on Fertility in Male Rats. **Nigerian Journal of Health and Biomedical Sciences**. v. 7.
- KANNO, J, et al. 2001. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic response: phase 1. **Environmental Health Perspectives**. v. 109, p. 785-794.
- KITAJIMA, M, et al. 2004. Histomorphometric alteration and cell-type specific modulation of arylhydrocarbon receptor and estrogen receptor expression by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 17 β -estradiol in mouse experimental model of endometriosis. **Reproductive Toxicology**. v. 18.
- KLAYMAN, D. 1985. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**. v. 228, p. 1049-1055.
- KOVACS, S D, RIJKEN, M J e STERGACHIS, A. 2015. Treating severe malaria in pregnancy: a review of the evidence. **Drug Safety**. v. 38, p. 165-181.

- LEITE, F H A, et al. 2013. Malaria: From old drugs to new molecular targets. **Biochemistry and Biotechnology Reports**. v. 2, p. 59-76.
- LONGO, M, et al. 2006. In vivo and in vitro investigations of the effects of the antimalarial drug dihydroartemisinin (DHA) on rat embryos. **Reproductive Toxicology**. v. 22, n. 4, p. 797-810.
- LOU, X E e ZHOU, H J. 2001. Effects of artesunate on progesterone estrogen content and decidua in rats. **Yao Xue Xue Bao**. v. 4, p. 254-257.
- LOUIS, G W, HALLINGER, D R e STOKER, T E. 2013. The effect of triclosan on the uterotrophic response to extended doses of ethinyl estradiol in the weanling rat. **Reproductive Toxicology**. v. 36, p. 71-77.
- MCGREADY, R, et al. 1998. 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.
- MCGREADY, R e NOSTEN, F. 1999. The Thai-Burmese border drug studies of Plasmodium falciparum in pregnancy. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v. 93.
- MCGREADY, R, et al. 2001. Artemisinin antimalarials in pregnancy: a prospective treatment study of 539 episodes of multidrug-resistant Plasmodium falciparum. **Clinical Infectious Disease**. v. 33, p. 2009-2016.
- MCGREADY, R, et al. 2006. Pharmacokinetics of dihydroartemisinin following oral artesunate treatment of pregnant women with acute uncomplicated falciparum malaria. **European Journal of Clinical Pharmacology**. v. 62, p. 367-371.
- MERCEREAU-PUIJALON, O e FANDEUR, T. 2003. Antimalarial activity of artemisinins: identification of a novel target? **The Lancet**. v. 362, p. 2035-2036.
- MESHNICK, S R, TAYLOR, T E e KAMCHONWONGPAISAN, S. 1996. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. **Microbiology Review**. v. 2, p. 301-315.
- MESHNICK, S R. 2002. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. **International Journal of Parasitology**. v. 32, p. 1655-1660.
- MILLER, L H, et al. 2013. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature Medicine**. v. 19, p. 156-167.
- MYINT, H Y, et al. 2004. A systematic overview of published antimalarial drug trials. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 98, p. 73-81.
- NELSON, E R, WARDELL, S E e MCDONNELL, D P. 2013. The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of estrogens, SERMs and oxysterols: implications for the treatment and prevention of osteoporosis. **Bone**. v. 53, n. 1, p. 42-50.

- NEVILL, A M. 1994. The need to scale for differences in body size and mass: an explanation of Kleiver's 0.75 mass exponent. **Journal of Applied Physiology**. v. 77, p. 2870-2873.
- NEWTON, P N e WHITE, N J. 1999. Malaria: new developments in treatment and prevention. **Annual Review of Medicine**. v. 50, p. 179-192.
- NOEDL, H. 2005. Artemisinin resistance: how can we find it? **Trends in Parasitology**. v. 21, n. 9, p. 404-405.
- O'MALLEY, B W. 2005. A life-long search for the molecular pathways of steroids hormone action. **Molecular Endocrinology**. v. 19, p. 1402-1411.
- O'NEILL, P M, BARTON, V E e WARD, S A. 2010. The molecular mechanism of action of artemisin - the debate continues. **Molecules**. v. 12, p. 1705-1721.
- OBIANIME, A W e APRIOKU, J S. 2009. Comparative study of artesunate, ACTs and their combinants on the spermatic parameters of the male guinea pig. **Nigerian Journal of Physiological Sciences**. v. 24, p. 1-6.
- OECD. 2007. Test No 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents. [Online] 2007. [Citado em: 01 de Setembro de 2015.]
- OLIVEIRA-FERREIRA, J, et al. 2010. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**. v. 115.
- OLUMIDE, S A e RAJI, Y. 2011. Long-term administration of artesunate induces reproductive toxicity in male rats. **Journal of Reproduction & Infertility**. v. 12, p. 246-260.
- PHIMPRAPI, W, et al. 2008. Longitudinal study of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in a Karen population in Thailand. **Malaria Journal**. v. 7, p. 1-11.
- POSNER, G H e O'NEILL, P M. 2004. 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.
- RATH, B, et al. 2010. Reproductive profile of artemisinins in albino rats. **Indian Journal of Pharmacology**. v. 3, p. 192-193.
- SÁ, I M D. 2011. A resistência à cloroquina e a busca de antimaláricos entre as décadas de 1960 e 1980. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**. v. 18, p. 407-430.
- SACHS, J e MALANEY, P. 2002. The economic and social burden of malaria. **Nature**. v. 415, p. 680-685.
- SEAQUAMAT. 2005. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. **The Lancet**. South East Asian Quinine Artesunate Malarial Trial Group, v. 366, p. 717-725.

SHARPE, R M e SKAKKEBAEK, N E. 1993. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? **The Lancet**. v. 341, p. 1392-1395.

SINGH, S, GIRI, A e GIRI, S. 2015. The antimalarial agent artesunate causes sperm DNA damage and hepatic antioxidant defense in mice. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 777, p. 1-6.

STOKER, T E, GIBSON, E K e ZORRILLA, L M . 2010. Triclosan Exposure Modulates Estrogen-Dependent Responses in the Female Wistar Rats. **Toxicological Sciences**. v. 117, p. 45-53.

SUNDAR, S N, et al. 2008. Artemisinin selectively decreases functional levels of estrogen receptor-alpha and ablates estrogen-induced proliferation in human breast cancer cells. **Carcinogenesis**. v. 12, p. 2252-2258.

TARUN, A S, et al. 2006. Quantitative isolation and in vivo imaging of malaria parasite liver stages. **International Journal for Parasitology**. v. 36, p. 1283-1293.

TAUIL, P, et al. 1985. A malária no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 34, n. 1, p. 71-111.

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

TU, Y. 2011. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. **Nature Medicine**. v. 17, p. 1217-1220.

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

VINETZ, J M, et al. 2012. Chemotherapy of malaria. The pharmacological basis of the therapeutics of Goodman & Gilman. 12ed. s.l. : AMGH. p. 1383-1417.

WANG, J, et al. 2015. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in Plasmodium falciparum. **Nature Communications**. p. 1-11.

WANG, T Y. 1989. Follow-up observation on the therapeutic effects and remote reactions of artemisinins (qinghaosu) and artemether in treating malaria in pregnant woman. **Journal of Traditional Chinese Medicine**. v. 8, p. 28-30.

WHITE, N J, HIEN, T T e NOSTEN, F H. 2015. A brief history of qinghaosu. **Trends in Parasitology**. v. 31, p. 607-610.

WHITE, T E, et al. 2006. Artesunate-induced depletion of embryonic erythroblasts precedes embryolethality and teratogenicity in vivo. **Birth Defects Research (Part B)**. v. 77, p. 416-429.

WHO. 2013. State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012. **World Health Organization**.

WHO. 2015. Guidelines for the Treatment of Malaria. 3rd edition. Geneva : **World Health Organization**. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK294440/>.

WMD. 2016. End malaria for good 2016. <http://www.worldmaliaday.org/>. [Online]. [Citado em: 29 de maio de 2016.]

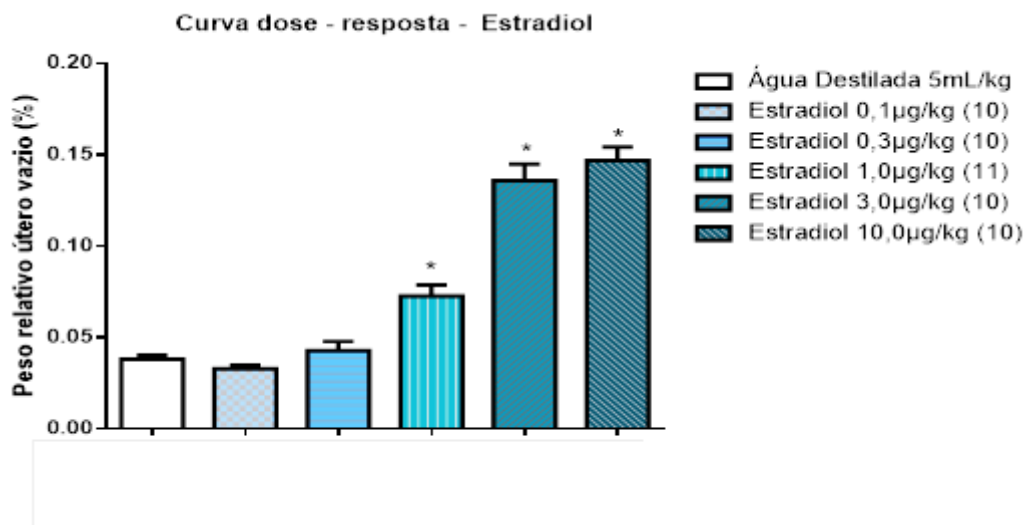
WOODROW, C J, HAYNES, R K e KRISHNA, S. 2004. Artemisinins. **Postgraduate Medical Journal**. v. 81, p. 71-78.

WU, Y. 2002. 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.

WU, Y e LIU, H H. 2003. Probing the possible molecular origin of the highly selective toxicity of antimalarial peroxide qinghaosu (artemisinin). **Chemical Research in Toxicology**. v. 16, p. 1202-1206.

XU, B, LOVRE, D e MAUVAIS-JARVIS, F. 2016. Effect of selective estrogen receptor modulators on metabolic homeostasis. **Biochimie**. v. 124, p. 92-97.

ZHOU, L, et al. 2016. Dihydroartemisinin, an antimalarial drug supresses estrogen deficiency-induced osteoporosis, osteoclast formation, and RANKL-induced signaling pathways. **Journal of Bone and Mineral Research**. v. 31, n. 5, p. 964-974.

ANEXO 1 CURVA DOSE-RESPOSTA DE ESTRADIOL ORAL

Curva dose-resposta ao estradiol. O controle negativo para estrogenicidade foi tratado com água destilada, 5 mL/kg por via oral. As doses de 17- α -etinilestradiol foram de 0,1; 0,3; 1; 3 e 10 μ g/kg/5 mL, v.o. Dados representam a média \pm EPM do peso relativo dos úteros vazios. O número de animais por grupo variou entre 10 e 11 animais, determinado na figura em parênteses ao lado dose utilizada. Nível de significância * $p < 0,05$ comparado com veículo (água destilada) através do teste ANOVA de uma via seguido por pós-teste de Bonferroni.