



## AValiação DA TOXICIDADE GENÉTICA DA SOLASODINA

Francine Bolico Latroni<sup>1</sup>  
Tanisa Brito Lanzarini<sup>2</sup>  
Rafael Rodrigues Dihl<sup>3</sup>

### Resumo

A solasodina possui, como uma de suas características, estrutura química adequada para ser utilizada como precursor para formação de hormônios esteroidais. Diversos estudos têm atribuído à solasodina uma série de atividades farmacológicas. Apesar dos efeitos farmacológicos benéficos, os alcalóides esteroidais apresentam toxicidade em diferentes organismos, inclusive em seres humanos. O presente estudo utilizou o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster* para avaliar a ação mutagênica e recombinogênica da solasodina em quatro concentrações, 3,75; 7,5; 15 e 30 mM. O SMART permite a detecção simultânea de mutação gênica e cromossômica, assim como de eventos relacionados com recombinação somática, possibilitando quantificar a contribuição deste último parâmetro genético para a genotoxicidade total do composto avaliado. Com relação aos resultados, não foram observados aumentos significativos nas frequências de clones mutantes, para nenhuma das classes de manchas, nas moscas expostas às diferentes concentrações avaliadas. A ausência de resultados positivos foi verificada tanto no cruzamento padrão quanto no cruzamento aprimorado. A maioria dos estudos indica que a citotoxicidade, e não a genotoxicidade, é o principal evento celular relacionado à toxicidade desta substância.

Palavras chave: SMART; *Drosophila melanogaster*; mutagênese; recombinogênese

### INTRODUÇÃO

A alta produção semissintética de hormônios esteroides colocou em evidência os derivados esteroidais, particularmente a diosgenina, melhor convertida a estes compostos. Entretanto, a solasodina é considerada uma alternativa ao uso da diosgenina, visto que se trata de um análogo considerado pró-fármaco proeminente (BARBOSA-FILHO et al., 1991). Muitas funções da solasodina têm sido recentemente descobertas e seu emprego em forma de fármaco semissintético está cada vez mais próximo (LECANU et al., 2011).

Silva et al. (2002) argumenta que, os estudos com espécies de *Solanum* da Paraíba revelaram a presença de 0,67 % do alcalóide solasodina nos frutos verdes de *Solanum paludosum* possuindo, este alcalóide, características como um importante precursor para formação de hormônios esteroidais. Os glicoalcalóides esteroides são amplamente encontrados em plantas deste gênero e bastante estudados atualmente acerca de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas (RODDICK; WEISSENBERG; LEONARD, 2001).

---

1 Aluno do curso de Ciências Biológicas da ULBRA – Bolsista PROBIC/Fapergs – fran\_latroni@hotmail.com

2 Aluno do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde — tanisa.lanzarini@terra.com.br

3 Professor dos cursos de Ciências Biológicas e Biomedicina e do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – rafael.rodrigues@ulbra.br

Glicoalcalóides são capazes de inativar diferentes vírus do herpes em humanos, de proteger camundongos de infecção por *Salmonella typhimurium*, de aumentar a duração de ação de anestésicos e de potencializar resposta imunológica em camundongos (FRIEDMAN; HENIKA; MACKEY, 2003).

Segundo Trouillas et al. (2004) os glicoalcalóides podem exibir propriedades antidiabéticas, antioxidantes e anticancerígenas como indutores de apoptose. Entretanto, em níveis similares aos encontrados em *Solanum tuberosum* (batata), os glicoalcalóides induziram malformações em roedores e em embriões de anfíbios (FRIEDMAN; HENIKA; MACKE, 2003). Estudos recentes demonstraram o potencial neuroprotetor da solasodina contra lesão cerebral induzida em ratos experimentais. Este estudo propõe que a neuroproteção oferecida pela solasodina possa ser atribuída a sua propriedade antioxidante (SHARMA et al., 2014). Por outro lado, a ingestão de solasodina foi capaz de causar perda de peso e hepatomegalia reversíveis em camundongos e é aparentemente mais tóxica a humanos que a roedores (FRIEDMAN; HENIKA; MACKEY, 2003).

Apesar dos efeitos farmacológicos benéficos, a solasodina apresenta toxicidade em diferentes organismos, inclusive em seres humanos. Neste sentido, são raros os estudos que avaliaram o potencial genotóxico deste composto (CRAWFORD E MYHR, 1995). Portanto, uma questão fundamental é se as manifestações toxicológicas descritas na literatura são influenciadas por efeitos genotóxicos da solasodina, considerando que muitas toxinas que agem no processo de desenvolvimento de um organismo são, também, genotoxinas. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação mutagênica da solasodina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

## METODOLOGIA

### AGENTES QUÍMICOS

A solasodina foi gentilmente cedida pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Viviane Souza do Amaral, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), a partir da colaboração da docente com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). A solasodina foi avaliada nas seguintes concentrações: 3,75, 7,5, 15 e 30 mM.

### TESTE SMART

#### CRUZAMENTOS

Foi empregado tanto o cruzamento padrão, no qual fêmeas virgens *flr*<sup>3</sup> foram cruzadas com machos *mwh*, originando larvas portadoras de nível basal de atividade metabólica dependente de citocromo P-450, como o cruzamento aprimorado, no qual as larvas apresentam níveis aumentados de enzimas de metabolização do grupo citocromo P-450 (HÄLLSTROM E BLANCK, 1985).

Estes cruzamentos originam larvas com duas constituições genotípicas, no que se refere aos genes marcadores localizados no cromossomo 3:

larvas *mwh* +/+ *flr*<sup>3</sup> - que são trans-heterozigotas para os marcadores recessivos *mwh* e *flr*<sup>3</sup>.

larvas *mwh* +/*TM3*,*Bd*<sup>S</sup> - heterozigotas para o cromossomo *TM3*, necessário para balancear o marcador *flr*<sup>3</sup>, já que este é letal em homozigose (GARCIA-BELLIDO E DAPENA, 1974). Os adultos heterozigotos para o cromossomo *TM3* apresentam recortes nas asas - determinados pelo gene marcador *Bd*<sup>S</sup> - o que permite diferenciá-los dos imagos trans-heterozigotos, que apresentam asas com formato normal.

## TRATAMENTOS E BASES GENÉTICAS DO TESTE

Os cruzamentos foram realizados em massa (80 fêmeas: 40 machos), durante 3 dias, em vidros contendo meio de cultura padrão. Após este período, os casais foram transferidos para tubos de ¼ l contendo meio de ovoposição, onde permaneceram por 8 h. Passado este tempo, os adultos foram descartados. Depois de 72h do início do período de ovoposição, foram coletadas larvas de terceiro estágio por flotação em água corrente. Estas larvas foram, então, submetidas a tratamento crônico com diferentes concentrações da solasodina.

Todos os adultos que nasceram 10-12 dias após a postura dos ovos foram conservados em etanol 70%. Posteriormente, as asas dos indivíduos trans-heterozigotos foram submetidas à montagem em lâminas de vidro. O tipo de mancha mutante observada nas asas dos adultos trans-heterozigotos permite a caracterização de eventos genotóxico distintos.

Dessa forma, as manchas simples, com os fenótipos pelos múltiplos ou pelos com a base alargada, podem se originar por:

- a) alteração do conteúdo informacional dos genes selvagens  $mwh^+$  ou  $flr^{3+}$ ;
- b) deleção de um fragmento cromossômico contendo os marcadores selvagens  $mwh^+$  ou  $flr^{3+}$ ;
- c) conversão gênica dos genes  $mwh^+$  ou  $flr^{3+}$ .

Além disso, a ocorrência de recombinação simples entre os locos  $mwh$  e  $flr^3$  leva ao aparecimento de manchas simples com o fenótipo pelos múltiplos, enquanto uma recombinação simples entre  $flr^3$  e o centrômero, seguida de uma segunda recombinação simples entre  $mwh$  e  $flr^3$  origina manchas contendo pelos com a base alargada.

Portanto, as manchas simples podem originar-se tanto por eventos mutacionais, incluindo mutações pontuais e aberrações cromossômicas, como por conversão ou recombinação somática. Por outro lado, as manchas gêmeas, que expressam simultaneamente os fenótipos com a base alargada e pelos múltiplos, originam-se exclusivamente de uma recombinação simples entre  $flr^3$  e o centrômero, com posterior segregação de um cromossomo recombinado e um parental (GRAF et al., 1989).

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação genotóxica da solasodina, as frequências de manchas obtidas foram comparadas com o controle negativo. Para tanto, foi utilizado o teste binomial condicional de Kastembaum e Bowman (1970), seguindo o procedimento de decisões múltiplas de acordo com Frei e Würigler (1988). Com o objetivo de confirmar os resultados positivos e excluir *outliers* foi utilizado o teste U de Wilcoxon, Mann e Whitney (FREI E WÜRGLER, 1995).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação à solasodina (Tabela 1), não foram observados aumentos significativos nas frequências de clones mutantes, para nenhuma das classes de manchas, nas larvas expostas às diferentes concentrações avaliadas. De fato, a ausência de resultados positivos foi observada tanto no CP quanto no CA.

Os resultados da avaliação tóxico-genética da solasodina, neste estudo, apontaram para a ausência de atividade genotóxica da substância. Considerando os parâmetros genéticos detectados pelo teste SMART, pode-se indicar que a solasodina não é capaz de induzir aumentos significativos nas frequências de manchas mutantes, seja por eventos mutacionais e/ou recombinacionais.

Tabela 1 - Resultados obtidos no teste SMART com a progênie trans-heterozigota (*mwh/flr<sup>3</sup>*) nos cruzamentos padrão (CP) e aprimorado (CA) após exposição crônica de larvas de 3º estágio a diferentes concentrações de Solasodina.

Cruzamentos e Tratamentos (mM)	No. De moscas (N)	Manchas por mosca (nº. de manchas) diagnóstico			Total de manchas <sup>b</sup> m = 2	Manchas com clones <i>mwh</i> <sup>c</sup>
		Manchas simples pequenas <sup>b</sup> (1-2 células) m = 2	Manchas simples grandes <sup>b</sup> (>2 células) m = 5	Manchas gêmeas m = 5		
<b>Padrão</b>						
CN <sup>d</sup>	50	0,84 (42)	0,14 (07)	0,02 (01)	1,00 (50)	50
3,75	50	0,98 (49) -	0,08 (04) -	0,02 (01) i	1,08 (54) -	54
7,5	50	0,92 (46) -	0,16 (08) i	0,02 (01) i	1,10 (55) -	54
15	50	0,62 (31) -	0,14 (07) i	0,04 (02) i	0,80 (40) -	39
30	50	0,38 (19) -	0,06 (03) -	0,04 (02) i	0,48 (24) -	24
CP <sup>e</sup>	10	2,80 (28) +	0,80 (08) +	0,00 (00) +	3,60 (36) +	35
<b>Aprimorado</b>						
CN <sup>d</sup>	50	0,96 (48)	0,22 (11)	0,00 (00)	1,18 (59)	58
3,75	50	1,10 (55) -	0,08 (04) -	0,02 (01) i	1,20 (60) -	60
7,5	50	0,88 (44) -	0,18 (09) -	0,06 (03) i	1,12 (56) -	55
15	50	0,84 (42) -	0,10 (05) -	0,06 (03) i	1,00 (50) -	40
30	50	1,02 (51) -	0,20 (10) i	0,04 (02) i	1,26 (63) -	62
CP <sup>e</sup>	10	23,10 (231) +	4,10 (41) +	3,00 (30) +	30,20 (302) +	298

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): -, negativo, +, positivo, i, inconclusivo.  $P \leq 0.05$ . <sup>b</sup>Incluindo manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras. <sup>c</sup>Foram considerados apenas os clones *mwh* das manchas simples *mwh* e das manchas gêmeas. <sup>d</sup>CN, controle negativo: Tween 80 5%. <sup>e</sup>CP, controle positivo: Uretano 20mM.

Além disso, a ausência de resultados positivos nos cruzamentos padrão e aprimorado indicam que esta substância não é capaz de induzir lesões no DNA de forma direta e indireta. Estudos envolvendo a avaliação genotóxica da solasodina são escassos na literatura científica. De fato, os trabalhos disponíveis são focados no efeito tóxico-genético de extratos das plantas por meio das quais esta substância é obtida.

Solasodina não apresentou efeito mutagênico em camundongos transgênicos CD2 *lacZ80/HazfBR*, quando avaliada para mutações no gene *lac Z*, para a dose máxima tolerável de 300mg/kg, aplicada via intraperitoneal (CRAWFORD E MYHR, 1995). Diversos estudos têm atribuído à solasodina uma série de atividades farmacológicas como: ação antimicrobiana (CHATAING *et al.*, 1998; WEISSENBERG *et al.*, 1998), anti-inflamatória e antinociceptiva (PANDURANGAN *et al.*, 2010, 2011), anticâncer (TROUILLAS *et al.*, 2005; CHANG *et al.*, 1998), antiandrogênica (GUPTA *et al.*, 2002; FRIEDMAN *et al.*, 2003) e sobre o sistema nervoso central (LECANU *et al.*, 2011; CHAUHAN *et al.*, 2011).

## CONCLUSÃO

Os resultados indicam que a solasodina não apresenta potencial genotóxico em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

## AGRADECIMENTOS

À FAPERGS pela concessão da bolsa PROBIC.

## REFERÊNCIAS

- BARBOSA-FILHO, José, et al. Chemical and pharmacological investigation of *Solanum* species of Brazil: a search for solasodine and other potentially useful therapeutic agents. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 86, suppl. 2, p. 189-191, 1991.
- CHATAING, B., et al. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in vitro by *Solanum* alkaloids: a comparison with ketoconazole. *Planta Med.* 1998; 64(1):31-6.
- CHANG, L.C., et al. The rhamnose moiety of solamargine plays a crucial role in triggering cell death by apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 242(1):21-5.
- CHAUHAN, K., et al. Anticonvulsant activity of solasodine isolated from *Solanum sisymbriifolium* fruits in rodents. *Pharm Biol.* 2011;49(2):194-9.
- CRAWFORD, L., MYHR, B. A preliminary assessment of the toxic and mutagenic potential of steroidal alkaloids in transgenic mice. *Food Chem Toxicol.* 1995;33(3):191-4.
- FRIEDMAN, Mendel; HENIKA, Philip; MACKEY, Bruce. Effect of feeding solanidine, solasodine and tomatidine to non-pregnant and pregnant mice. *Food and Chemical Toxicology*, v. 41, n. 1, p. 61-71, jan. 2003.
- FREI, H., WÜRGLER, F.E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research*, v. 334, p. 247-258, 1995.
- FREI, H., WÜRGLER, F.E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive. *Mutation Research*, v. 203, p. 297-308, 1988.
- GARCIA-BELLIDO, B. A.; DAPENA, J. Induction, deletion and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and General Genetics*, v. 128, p. 117-130, 1974.
- GRAF, U., et al. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*, v. 222, p. 359-373, 1989.
- GUPTA, R.S., DIXIT, V.P. Effects of short-term treatment of solasodine on cauda epididymis in dogs. *Indian J Exp Biol.*, v. 40, n. 2, p. 169-73. 2002
- HÄLLSTROM, I., BLANCK, A. Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster*. I. Chromosomal determination of some cytochrome P-450 dependent reactions. *Chemico-Biological Interactions*. v. 56, p. 157-171, 1985.
- LECANU, Laurent, et al. The naturally occurring steroid solasodine induces neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Neuroscience*, v. 183, p. 251-264, jun. 2011.

PANDURANGAN, A., KHOSA, R.L., HEMALATHA, S. Anti-inflammatory activity of an alkaloid from *Solanum trilobatum* on acute and chronic inflammation models. *Nat Prod Res.*, v. 25, p. 1132-41, 2011.

PANDURANGAN, A., KHOSA, R.L., HEMALATHA, S. Antinociceptive activity of steroid alkaloids isolated from *Solanum trilobatum* Linn. *J Asian Nat Prod Res.* 2010; 12(8):691-5.

RODDICK, James; WEISSENBERG, Martin; LEONARD, Anna. Membrane disruption and enzyme inhibition by naturally-occurring and modified chacotriose-containing *Solanum* steroidal glycoalkaloids. *Phytochemistry*, v. 56, n. 6, p. 603-610, mar. 2001.

SHARMA, T., et al. Solasodine protects rat brain against ischemia/reperfusion injury through its antioxidant activity. *Eur J Pharmacol.* 2014;725:40-6.

TROUILLAS, P., et al. Structure-function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. *Bioorg Med Chem*, v.13, n.4, p.1141-9, 2005