



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES MUTAGÊNICA E RECOMBINOGÊNICA DA HECOGENINA

Bruno Johann Savedra da Silva¹
Tanisa Brito Lanzarini²
Rafael Rodrigues Dihl³

Resumo

A hecogenina está presente nas folhas de espécies do gênero *Agave*, incluindo *Agave sisalana*, *Agave cantala* e *Agave aurea*, apresentando um amplo espectro de atividades farmacológicas já estudadas, como é o caso de sua ação antifúngica e hipotensiva. Apesar dos efeitos farmacológicos benéficos, são raros os estudos que avaliaram o potencial genotóxico de sapogeninas esteroidais, principalmente da hecogenina. Nesse sentido, considerando a escassez de informações relacionadas à ação biológica *in vivo* desse composto, somada a ausência de dados referentes à sua atividade recombinogênica, 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 hecogenina em quatro concentrações – 3,75; 7,5; 15 e 30 mM. Os resultados observados, por meio da análise de 50 indivíduos, indicam ausência de atividade genotóxica do composto investigado, visto que não houve diferença estatisticamente significativa na indução de clones mutantes das diferentes classes de manchas em relação ao controle negativo. Considerando o amplo espectro de aplicações farmacológicas e terapêuticas da hecogenina, as próximas investigações devem ser focadas na avaliação do potencial antigenotóxico desta substância.

Palavras chave: agliconas; SMART; *Drosophila melanogaster*; genotoxicidade

INTRODUÇÃO

A importância prática de algumas agliconas é a sua transformação em hormônios sexuais e compostos com estruturas análogas, constituindo a matéria-prima de uma indústria química altamente desenvolvida. Cita-se, como exemplo, a extração da hecogenina de *Agave sisalana*, a diosgenina de várias espécies de Dioscoreae e outras utilizadas na síntese de hormônios esteróides do tipo foliculina ou progesterona (COSTA, 2002).

A hecogenina é um composto natural com diversas funções terapêuticas, utilizado principalmente como precursor na produção industrial de hormônios esteroidais. Trata-se de uma aglicona ou sapogenina esteroideal obtida comercialmente a partir do suco do sisal, produto descartado durante o processo de desfibramento de suas folhas (GHOGHARI E RAJANI, 2006).

A hecogenina, está presente nas folhas de espécies do gênero *Agave*, incluindo *Agave sisalana*, *Agave cantala* e *Agave aurea* (PAIK et al., 2005). Hecogenina apresenta um amplo espectro de atividades farmacológicas já estudadas, como ação antifúngica e hipotensiva (GONDIM, 2006). Além disso, recentemente, Cerqueira et al. (2012)

1 Aluno do curso de Ciências Biológicas da ULBRA – Bolsista PROBIC/Fapergs – brunojohnn94@gmail.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

demonstraram que as atividades antioxidante e anti-inflamatória associadas a hecogenina foram responsáveis pela ação gastro protetora em modelos experimentais de indução de úlcera gástrica em camundongos.

O Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) de asa, em *Drosophila melanogaster*, baseia-se na identificação de pelos com fenótipos mutantes que representam a expressão fenotípica da ocorrência de lesões em nível de DNA. Tais alterações são primordialmente induzidas nas células dos discos imaginais que, por inúmeras divisões mitóticas, darão origem às asas dos adultos com seus pelos ou tricomas. Os tricomas mutantes organizam-se em manchas, com fenótipos característicos, que indicam a ocorrência de eventos genéticos relacionados com mutações pontuais, aberrações cromossômicas e rearranjos estruturais devido à recombinação somática (ANDRADE et al., 2004).

Apesar dos efeitos farmacológicos benéficos, as agliconas esteroidais apresentam toxicidade em diferentes organismos, inclusive em seres humanos. Somado a isso, parece que a embriotoxicidade e citotoxicidade são os principais mecanismos por trás da toxicidade induzida por estes compostos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar a ação mutagênica da hecogenina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

METODOLOGIA

AGENTES QUÍMICOS

Hecogenina foi gentilmente cedida pela Prof^a. Dr^a. 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). As soluções de hecogenina foram preparadas na hora do tratamento, por dissolução em Tween-80 5%, assim como na ausência de luz direta. A hecogenina foi testada em quatro concentrações: 3,75, 7,5, 15 e 30 mM.

TESTE SMART

Foram utilizadas linhagens de *Drosophila melanogaster* portadoras de genes marcadores específicos, localizados no cromossomo 3, que permitem detectar a indução de mutação e recombinação em células somáticas. Tais linhagens são designadas como flr^3 , $ORR;flr^3$ e mwh e apresentam, respectivamente, as seguintes constituições genéticas:

- $flr^3 - flr^3/In(3LR)TM3,ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S$
- $ORR/ORR;flr^3 - ORR;flr^3/In(3LR)TM3, r^i p^p sep l(3)89Aabx^{34e} e Bd^S$
- $mwh - mwh/mwh$

Todos os estoques de *Drosophila melanogaster*, assim como os cruzamentos, foram mantidos em frascos de vidros de 1/4 l contendo meio de cultura padrão, a 25°C ±1°C e a umidade de 60-70%.

Para a realização do teste, foi utilizado o cruzamento padrão (CP), no qual fêmeas virgens flr^3 foram cruzadas com machos mwh , originando larvas portadoras de nível basal de atividade metabólica dependente de citocromo P-450, e o cruzamento aprimorado (CA), que se baseia no cruzamento de fêmeas virgens $ORR;flr^3$ com machos mwh . As fêmeas $ORR;flr^3$ são portadoras de cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem *Oregon* (R) resistente ao DDT. Um gene principal (R), presente no cromossomo 2, juntamente com genes menores existentes no cromossomo 1, confere a esta linhagem alto nível constitutivo de citocromo P450 (HÄLLSTROM E BLANCK, 1985).

As larvas oriundas de cada cruzamento foram submetidas ao tratamento crônico com as diferentes soluções de hecogenina, além dos controles negativo (Tween-80 5%) e positivo (Uretano 20 mM). Todos os adultos que nascerem 10-12 dias após a postura dos ovos foram conservados em etanol 70%. Posteriormente, as asas dos indivíduos trans-heterozigotos foram

removidas e colocadas em lâminas de vidro para serem analisadas em microscópio óptico com aumento de 400 x. Os diferentes tipos de manchas são designados como simples *mwh* ou *flr³*, quando apenas um dos marcadores se expressa, ou como manchas gêmeas, quando tanto pelos múltiplos (*mwh*), como pelos com a base alargada (*flr³*) estão presentes dentro de uma mesma mancha. São considerados clones independentes aqueles separados por 3 ou mais fileiras de tricomas normais (GRAF et al., 1984).

Para análise da atividade mutagênica da hecogenina, as frequências de manchas obtidas nas diferentes diluições deste composto foram comparadas às encontradas no controle negativo. Para tanto, foi utilizado o teste condicional de Kastebaum e Bowman (1970), seguindo o procedimento de decisões múltiplas de acordo com Frei e Würigler (1988), que é aplicado sobre duas hipóteses e permite a obtenção de quatro diagnósticos estatísticos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a hecogenina (Tabela 1), foi observado apenas um resultado positivo, restrito às manchas gêmeas na concentração de 7,5 mM do CP, não tendo reflexo no total de manchas. De fato, nenhuma das concentrações de hecogenina induziu aumentos significativos nas frequências totais de manchas, tanto no CP como no CA, indicando ausência de atividade mutagênica e/ou recombinogênica associada à hecogenina.

Tabela 1 - Resultados obtidos no teste SMART com a progênie trans-heterozigota (*mwh/flr³*) nos cruzamentos padrão (CP) e aprimorado (CA) após exposição crônica de larvas de 3º estágio a diferentes concentrações de Hecogenina

Cruzamentos e Tratamentos (mM)	Nº. de moscas (N)	Manchas por mosca (nº. de manchas) diagnóstico				Manchas com clones <i>mwh</i> ^c
		Manchas simples pequenas ^b (1-2 células) m = 2	Manchas simples grandes ^b (>2 células) m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de manchas ^b m = 2	
Padrão						
CN ^d	50	0,84 (42)	0,14 (07)	0,02 (01)	1,00 (50)	50
3,75	50	0,70 (35) -	0,08 (04) -	0,06 (03) i	0,84 (42) -	41
7,5	50	0,72 (36) -	0,10 (05) i	0,14 (07) +	0,96 (48) -	47
15	50	0,60 (30) -	0,08 (04) -	0,02 (01) i	0,70 (35) -	35
30	50	1,04 (52) -	0,02 (01) -	0,00 (00) i	1,06 (53) -	52
CP ^e	10	2,80 (28) +	0,80 (08) +	0,00 (00) i	3,60 (36) +	35
Aprimorado						
CN ^d	50	0,96 (48)	0,22 (11)	0,00 (00)	1,18 (59)	58
3,75	50	1,02 (51) -	0,04 (02) -	0,02 (01) i	1,08 (54) -	54
7,5	50	0,66 (33) -	0,10 (05) -	0,02 (01) i	0,78 (39) -	39
15	50	0,68 (34) -	0,10 (05) -	0,02 (01) i	0,80 (40) -	40
30	50	0,70 (35) -	0,16 (08) -	0,02 (01) i	0,88 (44) -	44
CP ^e	10	23,10 (231) +	4,10 (41) +	3,00 (30) +	30,20 (302) +	298

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): -, negativo, +, positivo, i,

inconclusivo. $P \leq 0.05$. ^bIncluindo manchas simples flr³ raras. ^cForam considerados apenas os clones mwh das manchas simples mwh e das manchas gêmeas. ^dCN, controle negativo: Tween-80 5%. ^eCP, controle positivo: Uretano 20mM.

São raros os trabalhos disponíveis na literatura que investigaram a ação genotóxica/antigenotóxica da hecogenina, inclusive, o mesmo é observado para as plantas do gênero *Agave*, nas quais a hecogenina é um das principais substâncias presentes nas folhas (PAIK *et al.*, 2005). Neste sentido, Camoutsis *et al.* (2005) investigaram a atividade genotóxica de ésteres de hecogenina e de aza-homo-hecogenina em cultura de linfócitos humanos por meio do teste de trocas entre cromátides irmãs (SCEs). Os autores observaram que a hecogenina não foi capaz de induzir aumentos significativos de SCEs, não apresentando efeito genotóxico e/ou citostático. Entretanto, a partir da inserção de um grupo —NHCO— ao anel “C” do núcleo esteroidal da hecogenina, formando aza-homo-hecogenina, os autores verificaram um aumento significativo de SCEs e de atividade antiproliferativa nos linfócitos humanos analisados. Este resultado está provavelmente relacionado ao potencial indutor de alquilações originado a partir da modificação na estrutura química da hecogenina.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados observados no presente estudo, juntamente com dados da literatura científica, indicam que a hecogenina não apresenta potencial genotóxico. Portanto, tendo em vista o amplo espectro de aplicações farmacológicas e terapêuticas, as próximas investigações devem ser focadas na avaliação do potencial antigenotóxico desta substância, na busca da caracterização de sua ação quimiopreventiva.

AGRADECIMENTOS

À FAPERGS pela concessão da bolsa PROBIC.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, H.H.R.; REGULY, M.L.; LEHMANN, M. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). In: Henderson, DS (Ed.), *Drosophila Cytogenetics Protocols*, Totowa: Humana Press Inc., p 389-412, 2004.
- CAMOITSIS C., MOURELATOS D., PAIRAS G., MIOGLOU E.; GASPARINTOU C.; IAKOVIDOU Z. Synthesis and cytogenetic studies of structure-biological activity relationship of esters of Hecogenin and aza-homo-Hecogenin with N,N-bis(2) - chloroethyl)aminocinnamic acid isomers. *Steroids*, v. 70, n.9, p. 586-93, 2005.
- CERQUEIRA, G. *et al.* Effects of hecogenin and its possible mechanism of action on experimental models of gastric ulcer in mice. Original Research Article *European Journal of Pharmacology*, v. 683, n. 1–3, p. 260-269, 2012 .
- COSTA, A. *Farmacognosia*. Fundação Galouste Gulbenkian: Portugal: Lisboa. 2002. v. 2, p. 339-370.

GONDIM, K.L. Avaliação da atividade cardiovascular defitoestrógenos e caracterização do mecanismo de ação de diosgenina em ratos, Paraíba, 2006. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)** – Universidade Estadual da Paraíba.

GHOGHARI AM., RAJANI M. Densitometric determination of hecogenin from *Agave americana* leaf using HPTLC. **Chromatographia**, v. 64, n.1-2, p. 113-16, 2006.

FREI H., WÜRGLER F.E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive result. **Mutation Res**, v. 203, n.4, p. 297-308, 1988.

GRAF, U., WÜRGLER F.E., KATZ, A.J.; FREI, H.; JUON, H., HALL, C.B., KALE, P.G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v. 6, p. 153-188, 1984.

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.

KASTEMBAUM, M.A., BOWMAN, K.O. Tables to determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutat Res.**, v.9, n.5, p. 527-49, 1970.

PAIK, S.Y., KOK, K.H., BEAK, S.M., PAEK, S.H., KIM, J.A. The essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* pericarp induce apoptosis of HepG2 human hepatoma cells through increased production of reactive oxygen species. **Biol. Pharm. Bull**, v. 28, p. 802–807, 2005.