

**AÇÃO MODULADORA DA GENOTOXICIDADE DA *SOLANUM LYCOCARPUM* ST. HIL. EM MICRONÚCLEOS INDUZIDOS PELA CICLOFOSFAMIDA****PAULA MOIANA DA COSTA**

Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Depto de Biologia Geral/Universidade Federal de Goiás (UFG), Campus-II, 74001-970 Goiânia-GO

**HELENO DIAS FERREIRA**

Laboratório de Sistemática Vegetal, Depto de Biologia Geral(ICB), UFG Campus-II 74001-970 Goiânia-GO

**PEDRO HENRIQUE FERRI****SUZANA DA COSTA SANTOS**

Laboratório de Bioatividade Molecular /IQ/UFG Campus-II 74001-970 Goiânia-GO

**LÍDIA ANDREU GUILLO**

Laboratório de Bioquímica Celular/Depto de Bioquímica e Biologia Celular/ICB/UFG Campus-II 74001-970 Goiânia-GO

**LEE CHEN CHEN**

Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese/ Depto de Biologia Geral/ICB/UFG Campus-II 74001-970 Goiânia-GO chenlee@icb.ufg.br Autor para correspondência

**RESUMO:** *Solanum lycocarpum* St. Hil. (nome comum: Lobeira) é um arbusto comum no cerrado brasileiro. Os frutos verdes desta espécie são amplamente empregados na medicina popular como calmante, diurético, sedativo, antiepiléptico, antiofídico, no tratamento de diabetes, doenças venéreas, gripe, malária, tosse comprida, asma, úlcera, hepatites, verminoses e para diminuir níveis de colesterol. A literatura relata a presença de substâncias como solanina, solamargina e solasodina nos frutos verdes além de grande quantidade de taninos. No presente trabalho a atividade antigenotóxica do extrato dos frutos verdes de *S. lycocarpum* St. Hil. foi avaliada, utilizando o teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos (*Mus musculus*). Grupos de cinco animais foram tratados intraperitonealmente nas doses de 5mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg e 80 mg/kg do extrato de *S. lycocarpum* com administração concomitante de 4 mg/kg de ciclofosfamida. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical após 24 h do tratamento, e as preparações citológicas foram feitas de acordo com a metodologia de Heddle. Para todas as doses aplicadas, a frequência de micronúcleos foi avaliada em eritrócitos policromáticos (EPC). Os resultados obtidos mostraram uma redução significativa do número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) em medula óssea do camundongo em relação ao controle positivo (ciclofosfamida) ( $P < 0,01$ ). Dessa maneira, pelos resultados obtidos, pôde-se concluir que o extrato dos frutos de *Solanum lycocarpum* St. Hil. apresentou ação moduladora da genotoxicidade.

**PALAVRAS-CHAVE:** Antigenotoxicidade, camundongos ciclofosfamida, micronúcleo, *Solanum lycocarpum*.

**ABSTRACT:** *Solanum lycocarpum* St. Hil. (common name: "Lobeira") is a common shrub in the Brazilian cerrado vegetation. The green fruits of this species have been used in Brazilian folk medicine as calmative, diuretic, sedative, anti-epileptic, anti-helminthic, anti-ophidic, for diabetes management, venereal diseases, influenza, malaria, whooping cough, asthma, ulcer, hepatitics and to reduce cholesterol levels. Previous studies demonstrated the presence of substances as solanine, solamargine and solasodine in the green fruits, besides the high levels of tannins. In the present study, the antigenotoxic activity of the extract of green fruits of *S. lycocarpum* St. Hil. was evaluated by mouse bone marrow micronucleus assay in polychromatic erythrocytes. Groups of five animals were treated with the green fruits extract, by intraperitoneal administration in doses of 5 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg and 80 mg/kg treated concomitantly with a dose of 4 mg/kg of cyclophosphamide. The animals were sacrificed by cervical dislocation after 24 hours of treatment. The cytological preparation

was made according to Heddle's methodology. The antigenotoxicity was evaluated by micronucleated polychromatic erythrocytes frequency (MNPCE). The results demonstrated a significant decrease of MNPCE frequency ( $P < 0,01$ ) in polychromatic erythrocytes of the bone marrow of mice, compared to the positive control group (cyclophosphamide) for all applied doses. Our results indicated that the green fruits extract of *Solanum lycocarpum* St. Hil. showed a modulating action of genotoxicity.

**KEY WORDS:** Antigenotoxicity, mice, cyclophosphamide, micronucleus, *Solanum lycocarpum*.

## INTRODUÇÃO

Desde tempos antigos, as plantas têm sido comumente empregadas pela população no tratamento de diversas patologias e/ou como suplemento alimentar. O consumo dessas plantas tem aumentado acentuadamente nas últimas décadas devido a um retorno aos produtos naturais das populações (Woods, 1999; Khan et al., 2001; Who, 2002). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 80% da população mundial utiliza remédios a base de produtos naturais como recursos terapêuticos (Mitscher et al., 1987). De acordo com a Associação Brasileira de Indústria Farmacêutica, o consumo de medicamentos alopáticos aumentou 16%, enquanto o uso de produtos naturais cresceu cerca de 20 % no ano de 1995 (Adeodato et al., 1996).

A planta *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae), conhecida popularmente como "lobeira", "jurubebão" e "fruta-do-lobo", é uma planta comumente encontrada na região do cerrado brasileiro (Almeida et al., 1998). Os frutos verdes ou semi-maduros contêm altas taxas de taninos (Silva et al., 1994), além de outras substâncias como solanina, solasodina e solamargina (Almeida, 1998). Os frutos são utilizados na alimentação humana in natura ou em forma de doces caseiros (Silva et al., 1994) além de serem tradicionalmente empregados em infusões e macerações como diurético, calmante, sedativo, antiepilético, antiofídico, contra hepatites (Lorenzi, 1991), diabetes, obesidade, colesterol (Dall'Agnol & von Poser, 2000), asma, bronquite, doenças venéreas, gripe, malária, tosse comprida, úlcera e verminoses, além de anticoncepcional de animais (Almeida, 1998; Silva et al., 1994; Ortencio, 1994).

Já se conhece na literatura que muitos compostos naturais possuem capacidade de

causar lesões no DNA ou provocar mutações gênicas ou alterações cromossômicas. Esses compostos são genericamente denominados de agentes genotóxicos (Vogel, 1989). Os agentes genotóxicos mutagênicos causam mutação de ponto, que consistem em pequenas alterações no DNA não visíveis ao microscópio óptico. Os agentes genotóxicos clastogênicos induzem alterações cromossômicas estruturais e os agentes genotóxicos aneugênicos provocam alterações cromossômicas numéricas. Todos esses agentes podem levar à transformação celular e provocar alterações neoplásicas (Vieira, 1987).

Por outro lado, existem substâncias que são capazes de diminuir a frequência de mutações ou de prevenir seu aumento por diversos mecanismos de ação, como a diminuição do transporte do agente genotóxico, ativação de sistemas celulares que interceptam e desintoxicam mutágenos, estimulação do sistema de reparo do DNA e/ou eliminação de grandes danos através da indução da apoptose pela célula (De Flora & Ramel, 1988; De Flora, 1998). Assim, substâncias que atenuam a ação de agentes genotóxicos são genericamente denominadas de agentes antigenotóxicos (Miyaji et al., 2004).

Estudos realizados anteriormente no laboratório de Radiobiologia e Mutagênese da Universidade Federal de Goiás (Goiânia), utilizando o teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos na avaliação da atividade tóxica e genotóxica do extrato dos frutos de *Solanum lycocarpum* St. Hil. mostraram a presença da atividade tóxica dessa planta, porém não foi detectada a presença da ação genotóxica (Moiana da Costa, 2002).

No presente estudo, foi avaliada a atividade antigenotóxica (anticlastogênica e/ou antianeugênica) do extrato dos frutos dessa

planta utilizando-se o teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos (EPC) de medula óssea de camundongos *Mus musculus*.

O teste de micronúcleo *in vivo* (Heddle, 1973; Heddle et al., 1983), utilizando eritrócitos policromáticos da medula óssea de camundongos tem sido amplamente utilizado na avaliação da genotoxicidade e antígeno-toxicidade de substâncias. Trata-se de um método de alta confiabilidade, baixo custo, curta duração, simples e sensível, que por ser executado em mamíferos fornece uma boa correlação em seres humanos (Rabello-Gay, 1991; Ribeiro, 2003). Além disso, por utilizar animais vivos, inclui fatores como absorção, distribuição e metabolização da substância em avaliação (Sato & Tomita, 2001).

## MATERIAL E MÉTODO

### ANIMAIS

No presente estudo foram utilizados 35 camundongos machos, saudáveis, da espécie *Mus musculus* out bred, linhagem Swiss Webster, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás, apresentando peso corpóreo entre 30 e 40 g, com faixa etária entre 8 e 12 semanas. Os animais tiveram livre acesso a água e ração comercial e foram acondicionados em gaiolas plásticas de tamanho 40 x 33 x 16 cm, forradas com serragem de madeira e trocadas diariamente, em temperatura ambiente de aproximadamente 25°C e claridade luminosa natural. Em cada gaiola foram colocados no máximo sete animais e pelo menos após cinco dias de permanência no local é que se iniciaram os experimentos

### EXTRATO DO FRUTO DA *SOLANUM LYCOCARPUM* ST. HIL.

Os frutos verdes da *Solanum lycocarpum* St. Hil foram coletados no município de Silvânia, Goiás. Estes foram coletados e identificados por H.D. Ferreira e a exsiccata foi depositada no Herbário da Unidade de Conservação da UFG com o registro N° 20122/UFG. A coleta foi realizada em setembro de 1997, que corresponde a estação seca na região central do Brasil. O extrato dos frutos verdes da *Solanum lycocarpum* St. Hil. foi obtido por

percolação a frio com o etanol aquoso 96%. A evaporação do solvente em rota- evaporador conduziu ao extrato seco, o qual foi diluído em 80% de água destilada esterilizada e 20% de Tween(80%).

### DROGAS E REAGENTES

Neste estudo foram utilizados os seguintes reagentes: Ciclofosfamida -  $C_7H_{15}C_{12}N_2O_2P$  (Genuxal - Asca Médica), Fosfato de sódio dibásico -  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  (Merck), Fosfato de sódio monobásico -  $NaHPO_4 \cdot 12H_2O$  (Merck), Giemsa (Doles), Metanol-  $CH_4O$  (Ecibra), Soro bovino fetal estéril (Nutricell) e Tween (80%) (Synth).

### PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Grupos de cinco animais machos foram tratados por via intraperitoneal (i. p.), com extrato dos frutos da *Solanum lycocarpum* nas doses de 5 mg/Kg, 10 mg/Kg, 25 mg/Kg, 50 mg/Kg e 80 mg/Kg, juntamente com 4 mg/Kg de ciclofosfamida (CP). Para controle positivo, administrou-se uma dose de 4 mg/Kg de CP e para controle negativo, água destilada estéril. Para todas as doses utilizadas a frequência de micronúcleos foi avaliada no tempo de 24 horas pós-tratamento. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os fêmures retirados. As epífises do fêmur foram cortadas e a medula óssea lavada com 1 mL de soro fetal bovino. Após homogeneização da medula no soro, esta foi centrifugada a 300xg por 5 minutos. O sobrenadante foi parcialmente descartado, e o precipitado de células foi homogeneizado com pipeta Pasteur. Uma gota de suspensão celular foi então transferida para a lâmina de vidro, onde foi feito o esfregaço celular. Após secagem das lâminas, estas foram fixadas em metanol absoluto durante 5 minutos e coradas em solução de Giemsa tamponada com pH 6,8, por um período de 15 minutos (Heddle, 1973; Heddle et al., 1983). Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente e secadas em condições ambientais. Para cada animal foram confeccionadas quatro lâminas, duas das quais foram utilizadas na contagem e as outras duas foram armazenadas como reserva

## ANÁLISE CITOGENÉTICA

Para a avaliação da atividade antigenotóxica do extrato, foram analisados micronúcleos de eritrócitos policromáticos analisando-se 1000 EPC, conforme Schmid (1975). A confecção das lâminas e a contagem foram realizadas pelo procedimento "duplo cego" sendo estas analisadas em microscópio modelo Olympus BH-2 com objetivo de imersão (10x100).

### Análise Estatística

Na análise da atividade antigenotóxica da planta, os resultados da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) induzidos com diferentes doses do extrato dos frutos da *S. lycocarpum* juntamente com 4 mg/Kg de ciclofosfamida (CP) foram comparados com o do grupo controle positivo (CP) pelo teste t-Student, considerados como significativos valores de  $p < 0,01$

## RESULTADO E DISCUSSÃO

A avaliação da atividade antigenotóxica da *Solanum lycocarpum* St. Hil. foi realizada pelo teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos. Foi escolhida a via intraperitoneal de administração, pois essa via maximiza a exposição da medula óssea aos agentes químicos (Preston et al., 1981). O tempo de 24 horas pós-administração foi utilizado para a presente avaliação, pois, segundo Salamone et al. (1980), nesse tempo a droga testada em geral apresenta máxima ação.

Os resultados obtidos da frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (EPCMN) após o co-tratamento com ciclofosfamida (CP) e o extrato bruto do fruto verde de *S. lycocarpum* em diferentes doses estão apresentados na Tabela 1.

Os resultados do presente estudo (Tabela 1) mostraram que a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados

**Tabela 1** : Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) em 1000 EPC após 24 horas do co-tratamento com 4mg/Kg de ciclofosfamida (CP) e o extrato dos frutos verdes da *Solanum lycocarpum* St. Hil.

Tratamento	Dados Individuais (EPCMN/1000 EPC)					$\bar{x} \pm s$
	a	b	c	d	e	
Extrato + CP						
5 mg/Kg + 4mg/kg	14	18	18	16	15	16,20 ± 1,79*
10 mg/Kg + 4mg/kg	15	17	16	18	14	16,00 ± 1,58*
25 mg/Kg + 4mg/kg	15	18	17	15	18	16,60 ± 1,52*
50 mg/Kg + 4mg/kg	16	16	15	17	14	15,60 ± 1,14*
30 mg/Kg + 4mg/kg	7	6	7	5	8	6,60 ± 1,14*
C(+) CP	22	20	21	23	22	21,60 ± 1,14
C(-) H <sub>2</sub> O	2	1	3	3	1	2,00 ± 1,00*

\* $P < 0,01$  Diferença significativa em relação ao grupo controle positivo(CP) (pelo teste t - Student) considerados significativos valores de  $p < 0,01$

C(-) controle negativo (H<sub>2</sub>O - destilada estéril)

C(+) controle positivo (CP - ciclofosfamida)

(EPCMN) foi elevada nos animais tratados com controle positivo (CP), a média obtida de EPCMN /1000 EPC foi 21,6, e baixa nos tratados com controle negativo (H<sub>2</sub>O destilada estéril), a média foi de 2 EPCMN/1000 EPC. Nas doses de 5, 10, 25, 50 e 80mg/Kg do extrato da planta co-tratados com 4 mg/Kg de ciclofosfamida as médias de EPCMN/1000 EPC obtidas foram 16,2, 16,0, 16,6, 15,6 e 6,6, respectivamente. Em todas as doses aplicadas, foi mostrada uma redução estatisticamente significativa (P<0,01) no número de EPCMN. Este decréscimo é mais acentuado na dose de 80 mg/Kg. Assim, o extrato dos frutos da *S. lycocarpum* exibiu uma ação moduladora de genotoxicidade em eritrócitos policromáticos da medula óssea dos camundongos.

A atividade moduladora da atuação da CP pela planta possivelmente pode ser atribuída à ação de taninos, presentes em altas taxas nos frutos verdes de *S. lycocarpum* (Silva et al., 1994). Estudos anteriores já mostraram que geralmente os taninos suprimem aberrações cromossômicas induzidas por diversos agentes mutagênicos (Sasaki et al., 1988). Já se sabe que várias doenças degenerativas como câncer, esclerose múltipla, arteriosclerose e o próprio processo de envelhecimento estão associados a altas concentrações intercelulares de espécies reativas de oxigênio (Loft & Poulsen, 1996; Slupphaug et al., 2003). Estudos recentes mostram que vários taninos atuam como captadores de radicais livres, os quais interceptam espécies ativas de oxigênio formando espécies estáveis (Haslam, 1996; Simões, 2000). Assim, possivelmente, os taninos podem exercer uma certa ação de proteção contra agentes genotóxicos endógenos e exógenos.

## CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que o extrato do fruto da *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Lobeira) em co-tratamento com 4mg/Kg de ciclofosfamida apresentou uma ação moduladora da genotoxicidade em eritrócitos policromáticos da medula óssea de camundongos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Dra Ekaterina A.F. Botovchenco Rivera (Diretora do Biotério Central da UFG) pela grande disponibilidade no fornecimento e no ensinamento de cuidados especiais com animais e a Dr. Alberto José Centeno, Dra Ekaterina A.F. Botovchenco Rivera e Dr. Piero G. Delprete pela revisão do manuscrito e também agradecem ao CNPq, CAPES, FUNAPE e UFG pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adeodato, M., L. Oliveira & W. Oliveira. 1996. Uma farmácia no fundo de quintal. *Globo Ciência* 64: 41-44.
- Almeida, S. P. 1998. Cerrado: aproveitamento alimentar. p. 119-21. Embrapa, Goiás.
- Almeida, S. P., C. E. B. Proença, S. M. Sano & J. F. Ribeiro. 1998. Cerrado: espécies vegetais úteis. p. 332-335. Embrapa, Goiás.
- Dall'Agnol, R. & G. L. von Poser. 2000. The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the case of *Solanum lycocarpum* fruits. *J. Ethnofarmacol.* 71: 337-341.
- De Flora, S. 1998. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 402: 151-158.
- De Flora, S. & C. Ramel. 1988. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification overview. *Mutat. Res.* 202: 285-306.
- Haslam, E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug and medicines: possible modes of action. *J. Nat. Prod.* 59: 205-215.
- Heddle, J. A. 1973. A rapid in vitro test for chromosomal damage. *Mutat. Res.* 18: 187-190.
- Heddle, J. A., M. Hite, B. Kirkhart, K. Mavournin, J. T. MacGregor, G. W. Newell & M. F. Salamone. 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. EPA's gene-tox program. *Mutat. Res.* 123: 61-118.
- Khan, I. A., J. Allgood, L. A. Walker, E. A. Abourashed, D. Schelenk & W. H.

- Benson.** 2001. Determination of heavy metals and pesticides in ginseng products. *J. AOAC Internat.* 84: 936-939.
- Loft, S. & H. E. Poulsen.** 1996. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.* 74: 297-312.
- Lorenzi, H.** 1991. Plantas daninhas do Brasil. 2ª Ed. Ed. Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, 352p.
- Mitscher, L. A., S. Drake, S. R. Gollapudi & S. K. Okwute.** 1987. A modern look at folkloric use of anti-infective agents. *J. Nat. Prod.*, 50: 1025-1040.
- Miyaji, C. K., B. Q. Jordão, L. R. Ribeiro, A. F. Eira & I. M. S. Cólus.** 2004. Genotoxicity and antigenotoxicity assessment of shitake (*Lentinula edodes*(Berkeley) Pegler) using the Comet Assay. *Genet. Mol. Biol.* 27: 108-114.
- Moiana da Costa, P.** 2002. Avaliação da atividade tóxica, genotóxica e antigenotóxica da *Solanum lycocarpum* St. Hil. pelo teste de micronúcleo. Dissertação de mestrado. 73p. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.
- Ortencio, W. B.** 1994. Medicina popular do Centro-Oeste. Ed. Thesaurus, 120p.
- Preston, R. J., W. Au, M. A. Bender, J. G. Brewen, A. V. Carrano, J. A. Heddle, A. F. Macfee, S. Wolf & J. S. Wasson.** 1981. Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays, a report of the U.S. EPA's gene-tox program. *Mutat. Res.* 87: 143-188.
- Rabello-Gay, M. N.** 1991. Teste do micronúcleo em medula óssea. p. 83-90. In: Rabello-Gay, M.N., M. A.R. Rodríguez & R. Monteleone-Neto (Eds), Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese: Métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto-SP, Editora SBG.
- Ribeiro, L. R.** 2003. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. p. 173-200. In: Ribeiro, L.R., D.M.F. Salvadori & E.K. Marques (Eds), Mutagênese Ambiental. Canoas-RS, Editora Ulbra.
- Salamone, M., J. Heddle, E. Stuart & M. Katz.** 1980. Studies on 3 model agents mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutat. Res.* 74: 347-356.
- Sazaki, Y. F., H. Iamanish, T. Ohta, M. Watanabe, K. Matsumoto & Y. Shirasu.** 1988. Suppressing effect of tannic acid on UV and chemically induced chromosome aberrations in cultured mammalian cells. *Agric. Biol. Chem.* 52: 2423-2428.
- Sato, A. & I. Tomita.** 2001. Short-term screening method for the prediction of carcinogenicity of chemical substances: Current status and problems of an in vivo rodent micronucleus assay. *J. Heal. Scien.* 47: 1-8.
- Schmid, W.** 1975. The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31: 9-15.
- Silva, J. A., B. D. Silva, N. T. Junqueira & L. R. M. Andrade.** 1994. Frutas nativas dos cerrados. Embrapa, Brasília, 23p.
- Simões, C. M. O., E. P. Schenkel, G. Gsmann, J. C. P. Mello, L. A. Mentz & P. R. Petrovick.** 2000. Farmacognosia da planta ao medicamento. p.528-530. Ed. da UFSC, 2ª edição, Florianópolis, Santa Catarina.
- Slupphaug, G., B. Kavli & H. E. Krokan.** 2003. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* 531: 231-251.
- Vieira, E. G.** 1987. Avaliação de mutagenicidade por ensaios citogenéticos in vivo e in vitro. p.54-62. In: M. V. Garcia. (Ed.), Princípios Básicos da Genética Toxicológica. UNESP. São José do Rio Preto, São Paulo.
- Vogel, E. G.** 1989. Introduction into basic principles of genetic toxicology. Blok: Milieuverstoring Genotoxische Stoffen, Leiden (The Netherlands), 43p.
- World Health Organization.** 2002. Drug information. Herbal Medicines. Vol. 16. World Health Organization, Geneva.
- Woods, P. W.** 1999. Herbal healing. *Essence* 30: 42-46.

Recebido em 8.VII.2005  
Aceito em 19.VIII.2005