



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

MARINA SAMPAIO DE MENEZES CRUZ

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE GENÉTICA DE
PRODUTOS NATURAIS ATRAVÉS DE BIOENSAIOS DE CURTA
DURAÇÃO**

**NATAL
JULHO/2015**

MARINA SAMPAIO DE MENEZES CRUZ

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE GENÉTICA DE
PRODUTOS NATURAIS ATRAVÉS DE BIOENSAIOS DE CURTA
DURAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof^a Dr^a Viviane Souza do Amaral.

**NATAL
JULHO/2015**

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial
do Centro de Biociências

Cruz, Marina Sampaio de Menezes.

Investigação da toxicidade genética de produtos naturais através de bioensaios de curta duração / Marina Sampaio de Menezes Cruz. – Natal, RN, 2015.

60 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Viviane Souza do Amaral.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Mutagenicidade. – Dissertação. 2. Diosgenina. – Dissertação. 3. Citotoxicidade. – Dissertação. I. Amaral, Viviane Souza do. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB
575.224

CDU

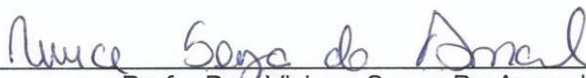
MARINA SAMPAIO DE MENEZES CRUZ

INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE GENÉTICA DE PRODUTOS NATURAIS
ATRAVÉS DE BIOENSAIOS DE CURTA DURAÇÃO

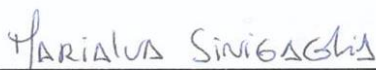
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em 30 de julho de 2015.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Viviane Souza Do Amaral
Departamento de Biologia Celular e Genética – UFRN
Orientadora



Profa. Dra. Marialva Sinigaglia
Examinadora Externa à Instituição - UFRGS



Dr. Matheus De Freitas Fernandes Pedrosa
Examinador Interno ao Programa - UFRN

Dedico este trabalho ao meu Pai, o maior amor dessa minha vida, o qual me deixou muitas saudades e um caminho acadêmico para que eu trilhasse. Pai, uma parte de você foi, mas tenha certeza que você continua vivo dentro de mim.

Ao meu pai, José Onilson de Menezes Cruz (in memorian) que sempre foi minha inspiração para seguir a vida acadêmica, guiou meu caminho em presença física e agora zela por mim de um lugar melhor.

À minha mãe, Tania Bezerra Sampaio, que sempre foi um exemplo de mulher corajosa e forte, sempre me apoiando, à qual tenho imensa admiração e amor.

À minha orientadora, Prof^a Dra. Viviane Souza do Amaral, meus sinceros agradecimentos pela imensa confiança que depositou em mim durante esse período, o que fez com que eu tivesse confiança em mim mesma e segurança nas atitudes e escolha decididas. Você sempre soube se colocar no lugar do aluno para compreender os momentos de desespero e alegria, sabendo pressionar na hora certa, mas deixar as coisas fluírem calmamente nos momentos apropriados. Agradeço também por todas as orientações, disponibilidade, e ensinamentos sobre a vida acadêmica, bem como pela enorme amizade que pode me proporcionar em todo esse tempo.

À Antônio, mais que um companheiro, um amigo para todas as horas, um guia para um mundo desconhecido, um amor para os momentos de afeto, um pai para os momentos de puxão de orelha, um professor para os momentos de aprendizado. Você foi uma peça chave nesse período da minha vida, me dando força quando eu só pensava em desistir, me dando ideias quando eu pensava que não podia fazer mais nada, me dando calma e felicidade quando tudo era uma tormenta. Espero contar com você para as próximas etapas que virão, nesses próximos muitos anos à frente! À você, meu sincero amor.

Aos meus amigos de longas datas (Priscila), da época do colégio (Maísa, Nara e Marcella) e da graduação (Luiz Eduardo, Victor, Luana, Fernanda e Diana), que souberam lidar com a grande ausência nesse período de mestrado, e que sempre fizeram com que os espaços vagos entre um encontro e outro fossem apagados quando nos encontrávamos. Eu tenho certeza que amizades assim serão para o resto da vida!

Aos meus colegas de turma de mestrado (Sinara, Kahena, Rômulo A., Rômulo C., Jota, Diego, Jonalson, Evelylyn, Ricardo, Ju), pessoas INCRÍVEIS, com uma conexão INCRÍVEL, que entraram em minha vida de supetão mas que fizeram meus dias mais engraçados, leves, construtivos, interessantes, cheios de conhecimentos científicos, principalmente sobre plantas e coisas do cotidiano!

Aos colegas de laboratório, Luiza, Emmanuel, Luiz Cláudio, por tantas horas de descontração em meio a tanta pressão. Principalmente a Sarah, que foi mais que um braço direito, me acompanhou sempre que necessário e até quando não precisava, com o intuito de aprender e ajudar. Agradeço a ajuda, a conversa leve, os risos e gargalhadas durante as horas intermináveis do ensaio cometa!

Agradeço a muitos laboratórios do Departamento de Bioquímica, mas principalmente ao BIOPOL e ao Prof^o Dr. Hugo Rocha, que foi praticamente um co-orientador, sempre que necessário cedendo seu espaço, tempo, equipamentos e reagentes, sendo também um grande amigo cheio de gracinhas!!! Do BIOPOL, devo um agradecimento ESPECIAL a Jailma, que foi uma irmã mais velha, me apeguei a

ela de cara, sempre soube me ensinar, ajudar, entender, e sempre estava comigo em muitos momentos, bons, ruins, felizes, tristes, principalmente de muitos bocadoitos e brownies de mariquinha!

Às técnicas Mayara e Ana Katarina, pela amizade descontraída e os ensinamentos que tornaram esse trabalho possível. Obrigada pela paciência no início em que as coisas não eram tão fáceis, e obrigada até mesmo só pela companhia quando eu já conseguia fazer tudo sozinha.

Aos alunos do LAMA, o laboratório esquecido, que sempre foram extremamente solícitos quando nos momentos que eu precisei de ajuda.

À CAPES e ao CNPq, por financiar e tornar esse projeto possível.

À todos que trilharam essa jornada ao meu lado, dando o apoio necessário principalmente nas horas de incerteza e dúvida, meus sinceros e eternos agradecimentos.

“A ciência consiste em substituir o saber
que parecia seguro por uma teoria, ou
seja, por algo problemático”

José Ortega y Gasset

RESUMO

Os produtos naturais derivados de plantas servem de matéria-prima para a síntese de fitoterápicos, sendo amplamente utilizados por várias populações em todo o mundo. Dentre estes compostos, destacam-se as saponinas e seus metabólitos. Seu intenso uso é decorrente de suas propriedades bioativas, somado a sua similaridade estrutural a hormônios. As saponinas derivam-se em sapogeninas, como, por exemplo, a Diosgenina e a Hecogenina. Além de serem utilizadas na indústria farmacêutica para a produção de hormônios e anti-inflamatórios esteroidais, estas duas sapogeninas também são empregadas como fitoterápicos, estando presentes também em vegetais que compõem a dieta de muitas populações. Apesar da vasta utilização destes compostos, existe uma falta de informações sobre a toxicidade genética, o que torna o consumo destas sapogeninas um risco para as populações. Diante deste contexto, o presente trabalho apresentou como objetivo investigar as potencialidades tóxicas, em nível celular e de DNA, da Diosgenina e da Hecogenina. Ensaio em células HepG2 para a avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade, e mutagenicidade foram realizados. Considerando os resultados obtidos com a Diosgenina, esta sapogenina revelou efeito citotóxico em concentrações acima de 30 μM , assim como induziu significativamente incrementos na frequência de danos no DNA e de micronúcleos. Por outro lado, a Hecogenina somente se revelou citotóxica acima de 150 μM , porém em concentrações abaixo deste valor, foi capaz de induzir danos ao material genético sem promover um aumento na frequência de micronúcleos. A análise do conjunto destes dados sugere que o consumo de alimentos, fitoterápicos ou de medicamentos que contenham a Diosgenina na sua composição apresenta um risco maior de toxicidade, quando comparados com as formulações a base de Hecogenina, uma vez que a Diosgenina apresenta um potencial mutagênico demonstrado por meio de um aumento significativo na frequência de micronúcleos que são biomarcadores de instabilidade genômica.

Palavras-chaves: Diosgenina, Hecogenina, Citotoxicidade, Genotoxicidade, Mutagenicidade.

ABSTRACT

Natural products derived from plants are used as raw material for the synthesis of phytotherapeutics, and are widely used by many populations around the world. Among these compounds, there are the saponins and its metabolites. Its intense use is due to its bioactive properties, added to its structural similarity to hormones. Saponins derived in sapogenins, as Diosgenin and Hecogenin. Besides its use by pharmaceutical industries to synthesis of steroidal hormones and anti-inflammatories, these two sapogenins are also used as phytotherapeutics, being also present in vegetables from diets of many populations. Despite the widespread use of these compounds, there are a lack of information about their genetic toxicity, which makes the use of these sapogenins a risk. Given this context, the present work aimed to investigate the toxic potential of Diosgenin and Hecogenin, at cellular and DNA level. Assays with HepG2 cells was performed to evaluate the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity. Considering the results obtained with Diosgenin, that sapogenin showed cytotoxic effects at concentrations higher than 30 μM , as well as significantly induced increases in frequency of DNA damage and micronucleus. On the other hand, Hecogenin only revealed cytotoxicity above 150 μM , however, at concentrations below this value, it was able to induce DNA damage without promote an increase in micronucleus frequency. The analysis of these results together suggests that the consumption of foods, phytotherapeutics or medicines containing Diosgenin on its composition, presents a higher risk of toxicity when compared with formulations with Hecogenin, since Diosgenin shows a mutagenic potential demonstrated by a significant increase in micronucleus frequency, which are biomarkers of genome instability.

Keywords: Diosgenin, Hecogenin, cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Estrutura química da Diosgenina	21
Figura 2	Representantes de espécies que contêm a Diosgenina	21
Figura 3	Forma acetilada da Hecogenina (acetato de Hecogenina); após transformações para o uso farmacológico	23
Figura 4	Representantes do gênero <i>Agave</i>	23
Figura 5	O ensaio cometa	27
Figura 6	Imagem do ensaio cometa em linfócitos tratados com H ₂ O ₂ . Corado com 4,6-diamidino-2-fenilindol	28
Figura 7	Formação do micronúcleo	29
Figura 8	Efeito da exposição durante 24 horas da Diosgenina na viabilidade de células HepG2. CN: Controle negativo (meio de cultivo celular + solvente). * representa diferença significativa entre a viabilidade das células tratadas com Diosgenina e o controle negativo (p<0.05).	37
Figura 9	Efeito da exposição durante 24 horas da Hecogenina na viabilidade de células HepG2. CN: Controle negativo (meio de cultivo celular + solvente). * representa diferença significativa entre a viabilidade das células tratadas com Hecogenina e o controle negativo (p<0.05).	38
Figura 10	Representação gráfica da contagem de colônias após 14 dias de tratamento com Diosgenina. CN: Controle Negativo (células expostas ao meio + solvente). *: Diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle negativo (p<0,05).	39
Figura 11	Ensaio clonogênico em células HepG2 tratadas com Diosgenina. (A) Controle negativo: meio de cultivo celular + solvente; (B) 40 µM; (C) 80 µM e (D) 100 µM de Diosgenina.	40
Figura 12	Representação das classes de dano ao DNA observadas usando o ensaio cometa. Cada foto representa uma unidade arbitrária de 0 a 4. (A) classe 0 – células intactas; (B) classe 1; (C) classe 2; (D) classe 3; (E) classe 4 – células com o máximo de dano (400x, aumento final). Fonte: Acervo pessoal.	41

- Figura 13** Parâmetros analisados no ensaio CBMN. (A) Célula binucleada sem anormalidades nucleares; (B) Célula binucleada com ponte nucleoplasmática (seta); (C) Célula binucleada com micronúcleo (seta); (D) Célula binucleada com brotos nucleares (seta). Fonte: Acervo Pessoal. **43**
- Figura 14** Efeito mutagênico da Diosgenina em células HepG2. As barras representam os micronúcleos, e os pontos, o NDI. Os resultados são mostrados como média \pm SD do número de MNs por 1000 células binucleadas de três experimentos diferentes. CN: controle negativo (meio de cultivo celular + solvente); CP: ciclofosfamida 0,2 mg/mL. * representa diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e o seu controle negativo referente a cada parâmetro ($p < 0,05$). **44**
- Figura 15** Efeito da Hecogenina na indução de MN (barras) e NDI (pontos) em células HepG2. Os resultados são mostrados como média \pm SD do número de MNs por 1000 células binucleadas de três experimentos diferentes. CP: ciclofosfamida 0,2 mg/mL. * representa diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e o seu controle negativo referente a cada parâmetro ($p < 0,05$). **45**

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Artigos publicados por alguns países da América Latina no período entre 1984-2004 oriundos das pesquisas com produtos naturais	16
Tabela 2	Distribuição de diferentes saponinas em tecidos vegetais de várias espécies de plantas	18
Tabela 3	Ensaio cometa em células HepG2 expostas a diferentes concentrações de Diosgenina	41
Tabela 4	Ensaio cometa em células HepG2 expostas a diferentes concentrações de Hecogenina	42

LISTA DE ABREVIATURAS

Ca²⁺	Íon cálcio
CBMN	Micronúcleo com bloqueio de citocinese,
Cito-B	Citocalasina B
CN	Controle Negativo
CO₂	Gás Carbônico
CP	Controle Positivo
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FDA	Food and Drug Administration
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
K⁺	Íon Potássio
LMP	Baixo ponto de fusão
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
mA	Miliampére
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MNs	Micronúcleos

MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NBUD	Broto Nuclear
NBRD	Ponte Nucleoplasmática
NDI	Índice de Divisão Nuclear
nm	Nanômetro
PBS	Tampão Fosfato
PI	Iodeto de Propídio
SCGE	Eletroforese de Célula única
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
V	Volts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Produtos Naturais e Fitoterápicos	15
1.2. As Saponinas	18
1.2.1. O Glicoalcalóide Esteroidal Diosgenina	20
1.2.2. O Glicoalcalóide esteroideal Hecogenina	22
1.3. Os fitoterápicos e os testes toxicológicos	24
1.3.1. Ensaio para avaliação de Apoptose.....	25
1.3.2. Ensaio de Genotoxicidade	26
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. Objetivos Gerais:.....	30
2.2. Objetivos Específicos:.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Materiais	31
3.1.1. Reagentes	31
3.1.2. Diosgenina e Hecogenina	31
3.2. Modelo Experimental	31
3.2.1. Linhagem Celular HepG2	31
3.3. Métodos	32
3.3.1. Teste de Viabilidade Celular (MTT)	32
3.3.2. Ensaio clonogênico.....	33
3.3.3. Eletroforese de única célula: Teste Cometa (SCGE).....	34
3.3.4. Teste de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (CBMN)	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Teste de Viabilidade Celular (MTT).....	36
4.2. Ensaio Clonogênico	38
4.3. Ensaio Cometa.....	40
4.4. Ensaio CBMN.....	42
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS.....	52

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos Naturais e Fitoterápicos

O uso de produtos naturais, principalmente derivados de plantas, é uma fonte tradicional de agentes terapêuticos para um amplo espectro de doenças que vem sendo utilizado por séculos, em todas as civilizações. Com os avanços científicos, hoje já é possível extrair compostos bioativos purificados, permitindo a utilização específica do composto que apresenta a atividade desejada (Calixto, 2000; Calixto, 2005; Cragg; Grothaus; Newman, 2014).

Mesmo com a grande diversidade sintética que foi obtida com a química combinatória, os produtos naturais e suas estruturas relacionadas continuam a ser elementos importantes das farmacopeias. Essas substâncias apresentam metabólitos secundários com imensa variedade funcional. No passado, métodos para identificar e caracterizar essas atividades não eram tão eficientes. Hoje, com o avanço nas tecnologias do século 21, como a genômica, proteômica, metabolômica e a bioinformática, houve uma aceleração na descoberta e análise desses metabólitos, permitindo uma maior utilização dos produtos naturais na indústria (Ngo; Okogun; Folk, 2013).

As plantas se sobressaem como fontes de moléculas bioativas devido à sua diversidade química. A fitoterapia refere-se ao emprego de plantas a fim de aliviar, curar ou mesmo prevenir um processo patológico. Os fitoterápicos são caracterizados quanto a sua eficácia, qualidade e segurança de uso (Bettega *et al.*, 2011).

Aproximadamente 25% das drogas prescritas no mundo têm origem vegetal. O mercado mundial de medicamentos fitoterápicos vem crescendo e movimenta cerca de US\$ 43 bilhões por ano, com a Europa e os Estados Unidos da América sendo os principais representantes (Turolla; Nascimento, 2006; OMS, 2013; Rokaya *et al.*, 2014). Estima-se que 70 – 80% da população mundial utilizem esses medicamentos, principalmente em regiões subdesenvolvidas e em desenvolvimento onde há uma grande difusão do uso de plantas medicinais, decorrente não só da acessibilidade, mas também da persistência de crenças e práticas culturais, da

redução dos efeitos adversos quando administrada de forma correta (Jordan; Cunningham; Marles, 2010), bem como da falta de acesso a medicina moderna e fármacos sintéticos em áreas mais pobres (Calixto, 2005; Rokaya *et al.*, 2014).

A distribuição das espécies vegetais com potencial de geração de produtos naturais bioativos está quase restrita a regiões das florestas tropicais. Nestas localidades, encontra-se mais da metade do número de espécies vegetais do planeta (Basso *et al.*, 2005). O Brasil está entre os países que realizam pesquisas nesta área, uma vez que a alta biodiversidade de plantas dentro do território brasileiro o capacita no desenvolvimento de novos metabólitos com valor terapêutico (Basso *et al.*, 2005). Entretanto, estima-se que apenas 25.000 espécies de plantas são alvos de pesquisas científicas, mesmo possuindo cerca de 22% de toda a flora existente no mundo.

O uso intenso de fitoterápicos em diversas populações, inclusive a brasileira, vem sendo alvo de estudos sobre a avaliação do risco do consumo destas formulações. Logo, observa-se um aumento considerável no número de pesquisas e publicações nesta área (Tabela 1). O cerne destes estudos é avaliar o risco do emprego das plantas medicinais no desenvolvimento de fitomedicamentos que já são amplamente utilizados no mercado, com o intuito de garantir que a população esteja consumindo um produto que apresente eficácia, segurança e qualidade.

Tabela 1 – Artigos publicados por alguns países da América Latina no período entre 1984-2004 oriundos das pesquisas com produtos naturais (adaptado de Calixto, 2005).

País	Ano de Publicação							Total
	84-86	87-89	90-92	93-95	96-98	99-01	02-04	
Brasil	24	34	252	378	622	981	1431	3722
México	08	13	111	233	363	463	607	1781
Argentina	15	15	98	176	339	495	603	1741
Chile	04	05	51	75	100	144	194	573
Venezuela	00	10	31	64	89	99	101	394
Colômbia	01	02	28	39	48	72	75	265
Peru	05	05	27	24	39	43	71	214
Cuba	01	01	07	13	42	58	62	184
Uruguai	01	01	01	05	13	22	26	69

Dados obtidos por meio destas pesquisas apontam para os efeitos mutagênicos de produtos derivados de plantas. Por exemplo, os flavonóides presentes no decocto de *Schinus terebinthifolius* (aroeira), planta muito usada como cicatrizante, são capazes de causar mutação direta em procariotos, ativar diferentes sistemas bacterianos (Carvalho *et al.*, 2003) e gerar danos oxidativos, interferindo na via de reparo de DNA por excisão de bases (Varela-Barca; Agnez-Lima; Medeiros, 2007). A planta *Eugenia caryophyllata* (cravo-da-índia), abundante em trópicos e muito utilizada para o tratamento de gastrite e diarreia, também exibiu capacidade de causar mutação direta em cepas selvagens de *Escherichia coli* (Santos *et al.*, 2008). Adicionalmente, os surfactantes obtidos do óleo de *Cocos nucifera* (coco), usados em formulações de cosméticos e higiênicos, também mostraram atividade mutagênica no teste de Ames (Petta *et al.*, 2004).

Entretanto, os dados sobre o perfil tóxico-genético dos produtos naturais provenientes de plantas ainda são muito escassos perante a enorme variedade de fitoterápicos empregados na medicina tradicional. Nesse contexto, falta validação científica apropriada para o uso clínico dos produtos naturais, sendo necessária a investigação laboratorial e a triagem clínica para sua adequada utilização (Cravotto *et al.*, 2010). De fato, há a exigência do Ministério da Saúde do Brasil para que haja a realização de testes de toxicidade para os fitoterápicos, incluindo a determinação da mutagenicidade e carcinogenicidade destes produtos em inúmeras circunstâncias. No Brasil, os fitoterápicos são registrados como fármacos e as indústrias farmacêuticas precisam provar sua eficiência, qualidade e segurança baseado em informação científica (Calixto, 2005). Porém, nem sempre estas exigências são cumpridas, além de muitas pessoas utilizarem formulações caseiras que não passam por nenhuma bateria de testes.

Dentre os produtos naturais com restritas informações acerca das suas propriedades tóxico-genéticas estão as saponinas que são amplamente utilizadas na indústria farmacêutica e na formulação de fitoterápicos.

1.2. As Saponinas

Acredita-se que as saponinas são as responsáveis pela atividade biológica de muitos compostos naturais, inclusive das plantas utilizadas na medicina tradicional. Elas são metabólitos secundários bastante comuns em plantas, que atuam como barreira química, fazendo parte de seu sistema de defesa contra patógenos e animais herbívoros (Augustin *et al.*, 2011). São encontradas nas mais variadas espécies, assim como em diferentes partes da planta (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição de diferentes saponinas em tecidos vegetais de várias espécies de plantas (Cheok; Salman; Sulaiman, 2014).

Parte da Planta	Espécie	Referência(s)
Semente	<i>Aesculus chinensis</i> <i>Bunge</i>	Chen, Li, <i>et al.</i> (2007)
	<i>Argania spinosa</i>	Alaoui <i>et al.</i> (2002)
	<i>Bryonia Laciniosa</i>	Patel, Santani, Shah, e Patel (2012)
	<i>Capsicum annum</i> L.	Iorizzi <i>et al.</i> (2002)
	<i>Chenopodium pallidicaule</i>	Rastrelli, De Simone, Schettino, e Dini (1996)
	<i>Chenopodium quinoa</i>	Dini, Schettino, Simioli, e Dini (2001), Verza <i>et al.</i> (2012), Zhu <i>et al.</i> (2002), Woldemichael e Wink (2001)
	<i>Trigonella foenum graecum</i> L.	Petit <i>et al.</i> (1995)
	Raiz	<i>Allium nigrum</i> L.
<i>Bupleurum chinense</i>		Hu, Cai e Liang (2008)
<i>Chiococca alba</i>		Borges, Valença, Lopes, Barbi e Silva (2013)
<i>Dioscorea panthaica</i>		Wang <i>et al.</i> (2012)
<i>Glycyrrhiza yunnanensis</i>		Ji <i>et al.</i> (2014)
<i>Paris polyphylla</i> var. <i>chinensis</i>		Liu <i>et al.</i> (2013), Zhang <i>et al.</i> (2010)
<i>Platycodon grandiflorum</i>		Sun <i>et al.</i> (2011)
<i>Vigna radiata</i> L.		Waller <i>et al.</i> (1999)
Folha	<i>Allium nigrum</i> L.	Mostafa <i>et al.</i> (2013)
	<i>Beaucarnea recurvata</i>	Eskander, Lavaud, e Harakat (2011)
	<i>Cordyline fruticosa</i>	Fouedjou <i>et al.</i> (2014)
	<i>Tribulus terrestris</i> L.	Dinchev <i>et al.</i> (2008)
	<i>Ziziphus jujube</i> , <i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>	Guo <i>et al.</i> (2011)
Bulbo	<i>Allium nutans</i> L.	Akhov, Musienko, Piacente, Pizza, e Oleszek (1999)
	<i>Allium nigrum</i> L.	Mostafa <i>et al.</i> (2013)

Continuação Tabela 2

Parte da Planta	Espécie	Referência(s)
Fruto	<i>Crocus sativus</i>	Rubio-Moraga <i>et al.</i> (2011)
	<i>Gleditsia sinensis</i> Lam.	Lian e Zhang (2013)
	<i>Momordica charantia</i>	Li, Liang, Chen, Wang and Zhao (2007), Lin <i>et al.</i> (2011), Liu, Lu <i>et al.</i> (2012)
	<i>Solanum xanthocarpum</i>	Patel, Patel, <i>et al.</i> (2012)
	<i>Tribulus terrestris</i> L.	Dinchev <i>et al.</i> (2008)
Caule	<i>Caryocar villosum</i>	Alabdul Magid <i>et al.</i> (2006)
	<i>Momordica charantia</i>	Lin <i>et al.</i> (2011)
	<i>Silphium asteriscus</i> L.	Masullo <i>et al.</i> (2014)
	<i>Tribulus terrestris</i> L.	Dinchev <i>et al.</i> (2008)
	<i>Vigna radiata</i> L.	Waller <i>et al.</i> (1999)
Pericarpo	<i>Sapindus mukorossi</i>	Huang <i>et al.</i> (2003)
Casca	<i>Yucca schidigera</i> Roezl	Kowalczyk, Pecio, Stochmal, e Oleszek (2011)
	<i>Harpullia austro-caledonica</i>	Voutquenne <i>et al.</i> (2005)
Tubérculo	<i>Ipomoea batatas</i>	Dini <i>et al.</i> (2009)
Flor	<i>Agave offoyana</i>	Pérez <i>et al.</i> (2013)

As saponinas são glicosídeos anfipáticos, produzidos por uma variedade de plantas, como as das famílias Dioscoreaceae, Asparagaceae, Solanaceae, Liliaceae e Amaryllidaceae. Elas apresentam uma região lipofílica formada por um esqueleto carbonado, ao qual é ligado um número variável de moléculas de açúcar em diferentes regiões, formando os motivos glicosídicos hidrofílicos da molécula. O esqueleto carbonado, também conhecido como aglicona ou sapogenina, pode conter 27 ou 30 carbonos, o que divide as sapogeninas em dois grupos: glicosídeos esteroidais ou triterpenóides, respectivamente. As saponinas com 27 carbonos também são conhecidas como glicoalcalóides esteroidais (Hostettmann; Marston, 1995; Cerqueira *et al.*, 2012; Challinor; De Voss, 2013; Cheok; Salman; Sulaiman, 2014).

Esses glicoalcalóides esteroidais são metabolizados durante a digestão por animais e humanos (Lee *et al.*, 2004), dando origem às agliconas esteroidais após a remoção da cadeia de açúcares. Normalmente, humanos e animais são expostos a

agliconas através de hidrólise (enzimática ou não) de glicoalcalóides *in vivo* (Friedman; Henika; Mackey, 2003).

Já foram descobertas várias atividades biológicas e propriedades farmacêuticas das saponinas, dentre elas propriedades citotóxicas, hemolíticas, moluscicida, anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, antiparasitária, antitumoral, antiviral (Sparg; Light; Van Staden, 2004; Challinor; De Voss, 2013), antidiabética, antiobesidade, antioxidante e estimuladora da resposta imune (Cheok; Salman; Sulaiman, 2014). O amplo espectro de bioatividade dessas moléculas tornou-as alvos de pesquisas para futuros fármacos (Challinor; De Voss, 2013).

Algumas sapogeninas apresentam atividade e estrutura semelhante às substâncias esteroides no metabolismo animal e por isso são conhecidas como fitoestrógenos, encontrando-se neste grupo a Diosgenina e a Hecogenina. São compostos amplamente utilizados para a produção de drogas semissintéticas, hormônios, anti-inflamatórios e moléculas esteroidais como potenciais terapêuticos para doenças em que há deficiência dessas moléculas no organismo (Dias *et al.*, 2007; Cerqueira *et al.*, 2012).

1.2.1. O Glicoalcalóide Esteroidal Diosgenina

A Diosgenina (C₂₇H₄₁O₃) (Figura 1) é uma sapogenina esteroidal, formada a partir da hidrólise da saponina Dioscina, derivada de plantas, dentre elas várias espécies de inhame selvagem do gênero *Dioscorea* (*Dioscorea composita*, *Dioscorea villosa*, *Dioscorea zingiberensis*), feno grego (*Trigonella foenum greaecum*) e *Costus speciosus* (Figura 2). Além de serem amplamente utilizadas como alimento na América Latina, leste europeu e Ásia (Raju; Bird, 2007), essas plantas também são utilizadas de forma clínica, principalmente na medicina tradicional chinesa (Liu *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Tada *et al.*, 2009).

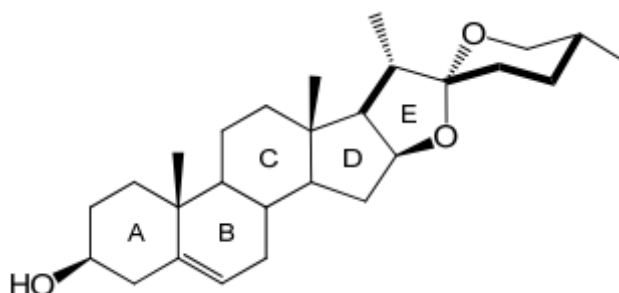


Figura 1 – Estrutura química da Diosgenina (Pabón *et al.*, 2013).



Genero *Dioscorea*

Trigonella foenum graecum

Costus speciosus

Figura 2 – Representantes de espécies que contêm a Diosgenina

A Diosgenina ganhou importância como sendo a principal molécula precursora na síntese industrial de esteroides, com ênfase na produção de progesterona (Raju; Bird, 2007; Dias *et al.*, 2007). Também é utilizada como molécula precursora de fácil obtenção para a semissíntese industrial da Diosgenona, molécula com alto potencial antimalárico (Pabón *et al.*, 2013).

Além de participar da síntese de moléculas, a Diosgenina apresenta um amplo espectro de atividades bioquímicas e farmacológicas, dentre elas a capacidade de inibir a melanogênese em células de melanoma de camundongo da linhagem B16 (Lee *et al.*, 2007), atividade anti-inflamatória, sendo capaz de inibir a ativação de NF- κ B e vias da MAPK em vários tipos celulares (Choi *et al.*, 2010; Hirai *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2013), bem como reduzir a liberação de

óxido nítrico estimulada por LPS em macrófagos de camundongos (Jung *et al*, 2010).

Também já foi relatado efeito protetor contra os danos causados pelo estresse oxidativo (Manivannan *et al*, 2013), ação protetora no infarto do miocárdio (Jayachandran; Vasavthi; Rajamanickam, 2009), retardamento da progressão da osteoporose (Higdon *et al*, 2001), redução da vaso tensão em artérias de rato (Dias *et al*, 2007), eficácia contra o envelhecimento da pele (Tada *et al*, 2009), regulação do perfil lipídico em casos de hiperglicemia (McAnuff *et al*, 2005), hipercolesterolemia (Juarez-Oropeza; Diaz-Zagoya; Rabinowitz, 1987) e hipertriacilglicerolemia (Kwon *et al*, 2003).

Efeitos antineoplásios da Diosgenina são bastante explorados. Já foi relatado o efeito antiproliferativo com interrupção do ciclo celular (Bian *et al.*, 2011) e apoptose em células tumorais a partir da desregulação de canais de Ca^{2+} e fragmentação de DNA (Liagre *et al*, 2004; Liu *et al*, 2005; Raju; Bird, 2007).

A Diosgenina já é amplamente utilizada em cosméticos, suplementos em dietas e na indústria farmacêutica, mas ainda não há estudos relacionados à sua possível capacidade de causar danos ao material genético. Desta forma, esta sapogenina torna-se alvo de pesquisas no campo da mutagênese.

1.2.2. O Glicoalcalóide esteroideal Hecogenina

A Hecogenina ($C_{27}H_{40}O_4$) é uma sapogenina esteroideal (Figura 3) presente em folhas do gênero *Agave*, incluindo *Agave sisalana*, *Agave cantala* e *Agave aurea*, comumente conhecida por “sisal”. Pertence à família Agavaceae, e são distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (Figura 4) (Paik *et al.*, 2005; Cerqueira *et al*, 2012; Gama *et al*, 2013).

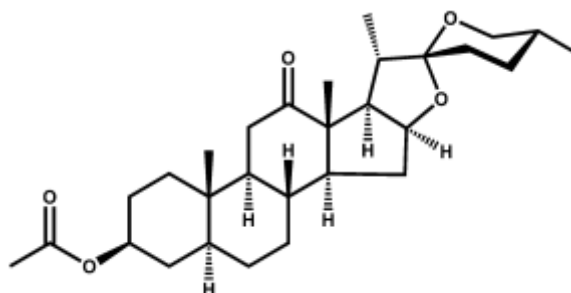


Figura 3 – Forma acetilada da Hecogenina (acetato de Hecogenina); após transformações para o uso farmacológico (Gama *et al.*, 2013).



Figura 4 – Representantes do gênero *Agave*.

As espécies do gênero *Agave* apresentam grande importância comercial, sendo utilizadas tanto como fonte para a síntese de fibras industriais, como também com propósito clínico, de forma empírica, pela medicina popular chinesa, sendo destinada para o tratamento de sarna, dores, inflamação e tumores (Gama *et al.*, 2013). Na indústria farmacêutica, também atua como fonte para a produção semissintética de hormônios esteroidais e anti-inflamatórios esteroidais (Zulo; Moraes, 1984; Serafini *et al.*, 2012).

A molécula apresenta um amplo espectro de atividades farmacológicas já estudadas, dentre elas a atividade antifúngica e hipotensiva (Gondin, 2006). O uso deste composto é bastante diversificado, sendo encontrado em hormônios sexuais, anti-inflamatórios, antibióticos, dentre outros. Estudos relatam que a Hecogenina

possui atividades antiproliferativas e pró-apoptóticas que são relacionadas aos estudos em câncer (Trouillas *et al.*, 2005; Gama *et al.*, 2013). Já foram relatados também efeitos antinociceptivo (Gama *et al.*, 2013), anti-inflamatório e anti-hematogênico (Peana *et al.*, 1997), efeito gastroprotetor mediado pela abertura de canais K^+_{ATP} (Cerqueira *et al.*, 2012), e também mostrou ser inibidor de UDP-glicuronosiltransferases, que são enzimas responsáveis pela detoxificação de várias toxinas ao organismo (Basu *et al.*, 2004; Hashizume *et al.*, 2008).

Os hormônios consumidos atualmente são compostos nos quais a matéria-prima utilizada para sua síntese é de origem vegetal ou animal. Entretanto, pelo fato da Hecogenina ter em sua estrutura moléculas totalmente saturadas, ela não é o precursor mais utilizado para a produção de esteróides. Aqueles nos quais a Hecogenina é usada como fonte são, principalmente: o cortisol, a prednisona, a prednisolona, a dexametasona e a betametasona. Estes compostos possuem estruturas moleculares bastante similares com a Hecogenina.

Apesar de amplamente utilizada, estudos sobre possíveis danos ao material genético causado pela Hecogenina ainda não foram realizados. Assim como a Diosgenina, esta sapogenina também se torna alvo de investigação na área da mutagênese.

1.3. Os fitoterápicos e os testes toxicológicos

O uso de plantas para o tratamento de enfermidades vem sendo relatado a séculos, já sendo uma tradição em muitas culturas (Bhattaram *et al.*, 2002). Em muitos países os fitoterápicos não são classificados como as demais drogas industriais, as quais precisam rigorosamente passar por uma bateria de ensaios garantindo sua qualidade antes de serem lançadas ao mercado. Eles geralmente são vendidos como suplemento dietético, privando o paciente de informações sobre sua farmacocinética e farmacodinâmica, além de muitas vezes, serem auto administrados pelo próprio paciente, sem o consentimento de um médico (Calixto, 2000; Capasso *et al.*, 2000).

O uso tradicional das plantas medicinais baseado em conhecimentos populares, juntamente com a crença de que por ser natural não causa efeitos adversos, fez com que raras plantas medicinais fossem avaliadas com ensaios pré-clínicos e clínicos, a fim de garantir sua eficácia (Turolla; Nascimento, 2006). O uso racional de fitoterápicos deve ser apoiado por investigações laboratoriais apropriadas e testes clínicos (Cravotto *et al*, 2010).

No Brasil, a legislação que rege os medicamentos fitoterápicos vem sofrendo alterações. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária elaborou normas para a regulamentação desses medicamentos, desde a Portaria n. 6 de 1995, a qual estabelece prazos para a apresentação de dados comprovando a eficácia e segurança dos fitoterápicos comercializados pelas indústrias farmacêuticas, passando pela RDC n. 17 de 2000, e a Resolução RDC n. 48 de 16 de março de 2004, em vigor, que dispõe do registro desses medicamentos (Turolla; Nascimento, 2006).

A comprovação da eficácia e segurança dos produtos naturais abrange também testes para a detecção de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, os quais são o enfoque desta pesquisa.

1.3.1. Ensaio para avaliação de Apoptose

1.3.1.1. Ensaio de Viabilidade celular (MTT)

Testes de citotoxicidade são amplamente utilizados *in vitro* para a investigação do potencial citotóxico de inúmeras substâncias em diferentes linhagens celulares (Rao, Sreedevi & Rao, 2009; Nikoloff *et al*, 2013). O teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é um ensaio sensível, quantitativo e colorimétrico que mede a capacidade de redução do sal MTT que é convertido em formazan. A redução é realizada por enzimas mitocondriais, por isso só ocorre em células metabolicamente ativas. Dessa forma a quantidade de formazan é diretamente relacionada ao número de células viáveis (Kosmider *et al*, 2004).

1.3.1.2. Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico vem sendo usado há décadas em várias linhagens celulares para a investigação da citotoxicidade (Rao, Sreedevi & Rao, 2009). Esse ensaio detecta células que mantêm sua capacidade de produzir um grande número de progenitores após um tratamento que possa impedir a reprodução celular devido a alterações no DNA (Brown & Attardi, 2005; Franken *et al.*, 2006).

1.3.2. Ensaio de Genotoxicidade

1.3.2.1. Ensaio Cometa (Single Cell Gel Electrophoresis – SCGE)

O ensaio cometa, conhecido formalmente por eletroforese em gel de células individuais (*single cell gel electrophoresis*), é um método rápido, sensível, relativamente simples e de baixo custo, para a visualização de danos no DNA em células individuais (Fikrová *et al.*, 2011; Azqueta; Collins, 2013). Ele apresenta uma variedade de aplicações na área da toxicogenômica, incluindo biomonitoramento humano, monitoramento ecológico e ferramenta para investigação de danos ao DNA e reparo em diferentes tipos de células (Jim *et al.*, 2009; Egito *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2012; Bhalli *et al.*, 2013; Leandro *et al.*, 2013; Marcussi *et al.*, 2013; Vasquez *et al.*, 2013).

Ele detecta danos no DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes, e pode ser realizado tanto em plantas como em animais, demonstrando grande sensibilidade e rapidez de resultados em estudos genotoxicológicos. Sua metodologia foi estabelecida em 1984, por Ostling & Johanson, e foi posteriormente aperfeiçoado por Singh *et al.* (1988), quando houve a modificação do pH da eletroforese (de neutro para alcalino), sendo o protocolo mais utilizado hoje em dia. Dessa forma, é possível detectar quebras de fita única e dupla, sítios alcali-lábeis e ligações cruzadas (Villela *et al.*, 2003; Azqueta; Collins, 2013).

Este teste consiste na remoção do conteúdo citoplasmático da célula, restando apenas o DNA intacto, o qual permanece com vários pontos intervalados de ancoragem em uma delicada matriz nuclear, podendo ser visualizado como uma

estrutura esférica contendo uma série de *loops* de DNA, conhecida por corpo nucleóide, cada qual representando uma única célula. Se houver algum dano no DNA nessas regiões de ancoragem, esses *loops* tornam-se relaxados e, quando submetidos a um campo eletroforético, tendem a se estender (Figura 5). Por isso, ao final do processo, as células são submetidas à eletroforese e depois coradas com substâncias capazes de se ligarem ao DNA, como o brometo de etídio ou nitrato de prata (Villela *et al.*, 2003; Azqueta; Collins, 2013).

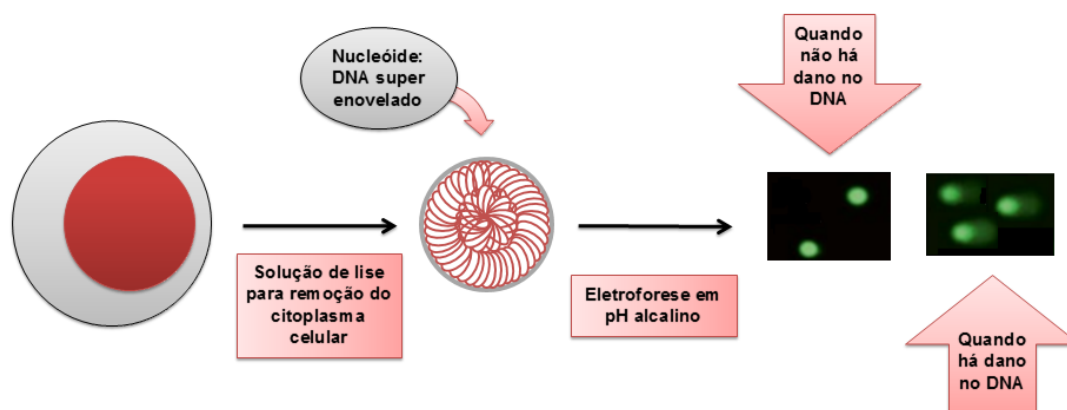


Figura 5 – O ensaio cometa (adaptado de Azqueta; Collins, 2013).

Ao microscópio os nucleóides contendo DNA intacto são redondos, enquanto que nas células lesadas observa-se a migração de DNA para fora do núcleo, característica que origina a nomenclatura do teste, onde o DNA danificado forma uma cauda semelhante a um cometa (Figura 6). A distribuição do DNA que forma a cauda se correlaciona com a extensão do dano ao DNA. Quanto mais danificado o material genético, mais *loops* se tornam relaxados, maior a quantidade de DNA na cauda visualizada e maior o seu tamanho (Villela *et al.*, 2003; Fikrová *et al.*, 2011).

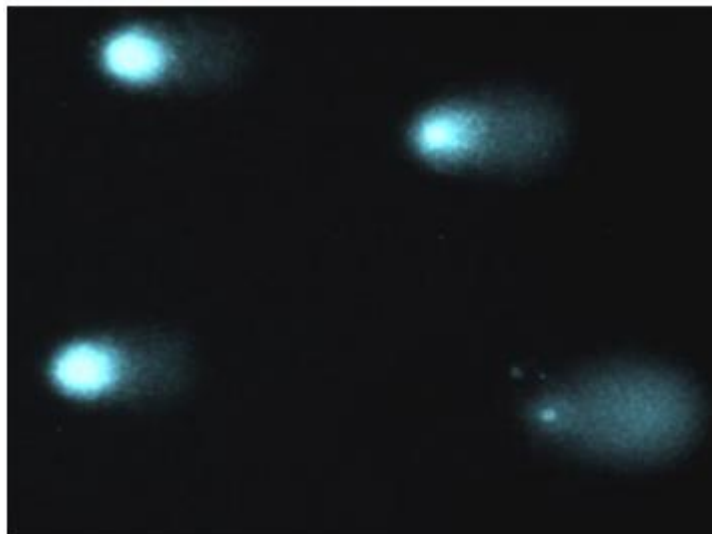


Figura 6 – Imagem do ensaio cometa em linfócitos tratados com H₂O₂. Corado com 4,6-diamidino-2-fenilindol (Azqueta; Collins, 2013).

1.3.2.2 Ensaio de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (CBMN)

Estudos sugerem que anormalidades cromossômicas são consequências diretas do dano ao nível do DNA e da perda e/ou não-disjunção cromossômica, causados, provavelmente, por defeitos no fuso mitótico, no centrômero ou como consequência de pouca condensação da estrutura cromossômica antes da metáfase (Fenech, 2000).

No CBMN (do inglês Cytokinesis-Block Micronucleus), um dos biomarcadores de dano ao DNA analisados são os micronúcleos, os quais são formados por quebras na dupla fita do DNA, gerando fragmentos acêntricos, ou por cromossomos inteiros que não migram para os polos celulares durante a divisão. Na telófase, uma membrana nuclear se forma em volta do cromossomo ou fragmento perdido, que logo adquire a morfologia de um núcleo em interfase, sendo um pouco menor, por isso chamado de micronúcleo (Fenech, 2000).

Eles podem ser visualizados em células eucarióticas que estão em divisão. Para identificá-las, é adicionada a citocalasina-B (cito-B) ao meio de cultura, substância que impede a formação dos filamentos de actina para a citocinese, bloqueando este passo da divisão celular. A cinética da cultura celular deve ser bem

definida para garantir que, no momento em que for adicionada a cito-B, as células se encontrem no final da primeira mitose. Assim, podem-se visualizar células binucleadas, indicando que estão em divisão e podem ser contabilizadas (Figura 7) (Fenech, 2000).

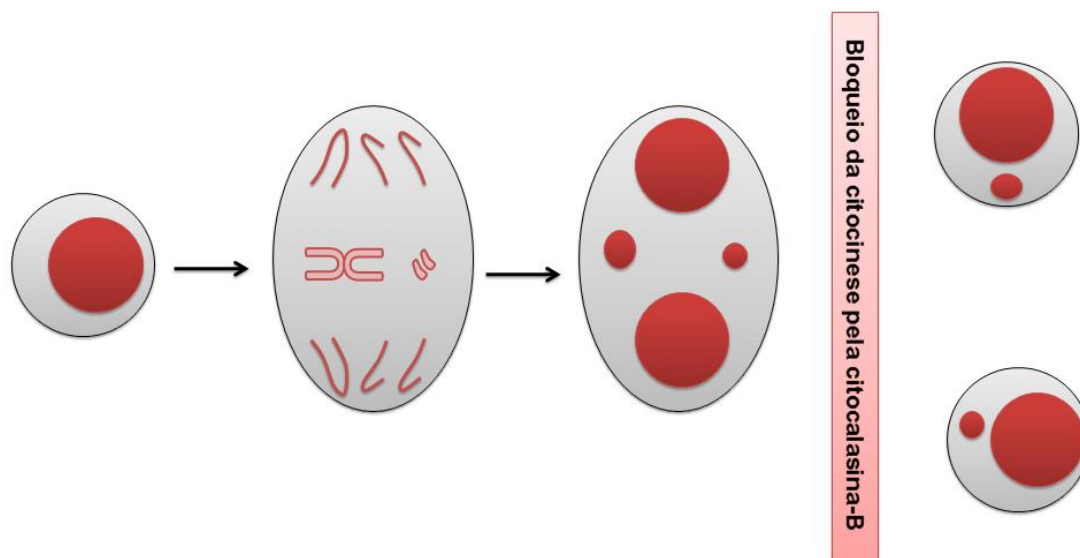


Figura 7 – Formação do micronúcleo (adaptado de Fenech *et al*, 2011).

A indução de quebras na fita simples e macrolesões no DNA avaliadas pelo ensaio cometa e CBMN, respectivamente, são características comuns observadas em diferentes células eucarióticas para identificar propriedades genotóxicas de xenobióticos, incluindo compostos naturais (Fenech, 2007; Zou et al, 2009; Leandro et al, 2013; Marcussi et al, 2013; Nikoloff; Larramendy; Soloneski, 2014). Além disso, o CBMN é um ensaio exigido pelas agências regulatórias e tem emergido como o método preferido para a avaliação tanto de dano clastogênico, como aneugênico, bem como sendo uma metodologia válida para o protocolo de análise de alterações cromossômicas (OECD, 1997, 2007; ICH, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais:

Avaliar o efeito citotóxico e, principalmente, o potencial genotóxico e mutagênico da Diosgenina e da Hecogenina através de bioensaios *in vitro* em células HepG2.

2.2. Objetivos Específicos:

- Avaliar o possível efeito citotóxico da Diosgenina e da Hecogenina, através de ensaios de viabilidade celular, e selecionar concentrações ideais para a realização dos testes de genotoxicidade e mutagenicidade;
- Verificar um possível efeito genotóxico da Diosgenina e da Hecogenina, ou seja, a possível capacidade destas sapogeninas causarem dano ao material genético;
- Investigar um possível efeito mutagênico da Diosgenina e da Hecogenina, ou seja, se os possíveis danos no DNA causados por estas sapogeninas são reparados ou são transmitidos para das células filhas durante a divisão celular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio bromídeo (MTT), citocalasina-B, ciclofosfamida, Tripsina-EDTA, Metanol, L-glutamina, meio Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – DMEM), estreptomicina/penicilina e soro fetal bovino foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). EDTA, tampão fosfato-salino (PBS 1X), cloreto de sódio, Tampão Tris base pH 10 e pH7,5, Triton X-100, DMSO, hidróxido de sódio, alguns deles adquiridos comercialmente, outros preparados no próprio laboratório.

3.1.2. Diosgenina e Hecogenina

A Diosgenina e a Hecogenina foram gentilmente fornecidas pelo Prof^o Dr^o José Maria Barbosa-Filho, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPB. A Diosgenina foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e a Hecogenina foi isolada de plantas da espécie *Agave sisalana*, purificada e identificada seguindo o protocolo descrito por Cerqueira *et al.* (2012). O pó seco da Diosgenina foi ressuscitado em metanol, enquanto a Hecogenina foi ressuscitada em acetona. A concentração final de metanol e acetona em cultura não excedeu 1% (Lasa *et al.*, 2002; Burgess *et al.*, 2008; Corona *et al.*, 2009). Os solventes orgânicos foram utilizados devido a propriedade hidrofóbica das moléculas testadas.

3.2. Modelo Experimental

3.2.1. Linhagem Celular HepG2

Vários xenobióticos precisam ser metabolizados para reagir com o DNA. Em função disso, ensaios com linhagens celulares que contenham enzimas metabolizadoras endógenas facilita o processo evitando o uso de enzimas

exógenas. A linhagem celular de hepatoma humano HepG2 é uma linhagem promissora para esse propósito, contendo várias enzimas metabólicas de fase I e II, importante para a ativação e detoxificação de compostos tóxicos ao organismo (Uhl; Helma; Knasmüller, 2000; Knasmüller et al, 2004).

Células HepG2 em cultura foram descongeladas e cultivadas em frascos de cultivo celular com superfície de 75 cm² com DMEM suplementado com 2% de L-glutamina, 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicillina e 100 U/mL de estreptomicina mantidos em ambiente estéril a 37°C e 5% de CO₂. Ao atingir confluência entre 80% e 95%, as células passavam pelo processo de subcultivo, onde eram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS), tripsinizadas com 1 mL de tripsina-EDTA e 30% das células era transferido a um novo frasco de cultivo celular com meio de cultura renovado. Após o terceiro subcultivo, os experimentos foram iniciados.

3.3. Métodos

3.3.1. Teste de Viabilidade Celular (MTT)

O ensaio foi realizado em células HepG2 segundo o protocolo de Mosmann (1983) com algumas modificações. Em cada placa de 96 poços, foram semeadas $5,0 \times 10^4$ células por poço e incubadas para aderência por 24 horas à 37°C e 5% CO₂. Após esse período, o meio de cultura foi removido e adicionado 100 µL por poço de meio de cultura sem soro fetal bovino, sendo as placas incubadas por mais 24 horas. Esse procedimento tem como objetivo a tentativa de manter todas as células na mesma fase do ciclo celular, devido a remoção de proteínas e demais componentes existentes no soro. Após esse período, o meio foi removido e adicionado 100 µL de meio suplementado no controle positivo, meio e solvente a 1% no controle negativo, e meio de cultura com as concentrações desejadas de cada composto (Diosgenina: 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM, 60 µM, 80 µM e 100 µM; Hecogenina: 10 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM e 200 µM). As concentrações a serem testadas foram escolhidas através da busca na literatura pelo intervalo de concentrações de Diosgenina e de Hecogenina que apresentavam atividades

biológicas. Após 24 horas de incubação, o meio foi removido e adicionado 100 µL em cada poço da solução de 1 mg/mL de MTT. As placas foram incubadas por mais 4 horas protegidas da luz. Após esse período, a solução de MTT foi descartada, e 100 µL de etanol foram adicionados em cada poço para a solubilização dos cristais de formazan formados.

As placas foram lidas em espectrofotômetro com leitor de microplacas em filtro de 570 nm. A análise estatística foi feita através do software SPSS versão 20, utilizando o teste paramétrico ANOVA, seguido do teste de comparação de Dunnet ($p < 0,05$). Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes independentemente.

3.3.2. Ensaio clonogênico

Para avaliar a capacidade clonogênica das células tratadas com Diosgenina, o ensaio foi realizado como anteriormente descrito por Franken *et al.* (2006) com pequenas modificações. Foram plaqueadas 3×10^3 células por poço em placas de 12 poços. Após 24 horas de crescimento a 37°C as células foram expostas a diferentes concentrações da Diosgenina (40 µM, 80 µM e 100 µM). Após 14 dias de incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com metanol e ácido acético (v/v = 3:1) durante 30 minutos, em seguida, coradas com Giemsa, durante 15 minutos, e, finalmente, lavada com água destilada e colocadas para secar à temperatura ambiente. Os experimentos foram repetidos três vezes. As colônias contendo mais de 50 células (> 50 uM) foram contadas visualmente em quadrantes de 1 mm x 1 mm escolhidos aleatoriamente (Das et al, 2009).

Os dados foram analisados estatisticamente através do software SPSS v.20 utilizando os testes não-paramétricos Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, com o nível de significância estabelecido em $p < 0,05$. O experimento foi realizado duplicata e repetido três vezes independentemente.

3.3.3. Eletroforese de única célula: Teste Cometa (SCGE)

O ensaio cometa foi realizado seguindo o protocolo já estabelecido por Hartmann *et al.* (2003) com pequenas modificações. Foram plaqueadas 10^5 células por poço em placas de 6 poços e incubadas durante 24 horas. Após o período de incubação, as células foram expostas à diferentes concentrações de Diosgenina (20 μ M, 40 μ M e 60 μ M) e de Hecogenina (10 μ M, 25 μ M e 50 μ M) durante 24 horas. Para o controle positivo, as células foram expostas a 30 μ M de H_2O_2 , e para o controle negativo foram expostas ao meio e aos solventes, no mesmo período dos tratamentos.

Em seguida, as suspensões de células foram misturadas com 100 μ l de 1% (m/v) de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e colocadas em lâminas pré-revestidas com 1,5% (m/v) de agarose de ponto de fusão normal. Após a solidificação de agarose, as lâminas foram submersas em tampão de lise (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM Tris-HCl, com 10% de DMSO e 1% Triton X-100 adicionados na hora, pH 10,0) durante 3 horas. Neste passo, a membrana celular e nuclear foram lisadas e as proteínas removidas, deixando apenas um nucleóide em cada célula. Em seguida, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese e mergulhadas em tampão de eletroforese (NaOH 10 M de EDTA e 200 mM, pH 13,0, 4°C) durante 20 minutos para permitir o desenrolamento do DNA e exposição dos sítios alcali-lábeis.

A eletroforese foi realizada durante 30 minutos a 30 V e 400 mA. Após a eletroforese, as lâminas foram mergulhadas em tampão de neutralização (0,4 M de tampão Tris-HCl; pH 7,5) duas vezes durante 5 minutos, e lavadas com etanol 100% três vezes antes da coloração.

As lâminas foram coradas com nitrato de prata, de acordo com Nadin *et al.* (2001). Em primeiro lugar, o material foi fixado em solução fixadora (15% de ácido tricloroacético, 5% de sulfato de zinco hepta-hidratado e 5% de glicerol, 10 minutos) e colocados para secar à temperatura ambiente até o dia seguinte. Para a coloração, as lâminas foram reidratadas em água destilada durante 5 minutos. Em seguida, elas foram coradas no escuro a 37°C por uma mistura de 32 mL de solução A (carbonato de sódio a 5%) e 68 ml de solução B (0,02% de nitrato de amônio,

0,02% nitrato de prata, 0,1% ácido tungstosilícico e 0,05% formaldeído). No final as lâminas foram lavadas com água destilada e submersas numa solução de parada (ácido acético a 1%, 5 minutos), e em seguida, colocados para secar à temperatura ambiente, estando prontas para análise.

As fotos foram tiradas com microscópio óptico equipado com sistema de captura de imagem (Olympus, Japão). Cento e cinquenta células foram avaliadas visualmente de acordo com o tamanho da cauda e a quantidade de DNA presente na cauda. As Diretrizes e Recomendações Internacionais para o Teste Cometa valida a avaliação visual dos cometas, considerado um método bastante fidedigno, uma vez que os resultados são altamente correlacionados com a análise de imagem obtida por software em computador (Collins *et al.*, 2008). Tal como descrito por Collins *et al.* (2008), para cada cometa foi dada uma unidade arbitrária de 0 a 4 (0 - não danificado; 4 – maior grau de dano). A pontuação do dano foi assim atribuída a cada amostra e pode variar de 0 (nenhum dano: 150 células x 0) para 600 (dano máximo: 150 células x 4).

A análise estatística foi realizada através do software SPSS v.20 utilizando os testes não-paramétricos Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, com o nível de significância estabelecido em $p < 0,05$. O experimento foi repetido três vezes independentemente.

3.3.4. Teste de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (CBMN)

O CBMN foi realizado segundo o protocolo descrito por Fenech (2007), com algumas modificações. Em placas de cultivo celular de 6 poços, foram semeadas 5×10^5 células por poço e incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, o meio foi descartado, os poços lavados com PBS duas vezes, e acrescentados 2 mL de meio com o respectivo solvente de cada composto para controle negativo, 2 mL de meio com as concentrações desejadas para teste de cada composto (Diosgenina: 30 µM, 40 µM e 50 µM; Hecogenina: 10 µM, 25 µM e 50 µM), e 2 mL da solução de ciclofosfamida a 0,2 mg/mL para o controle positivo. Todas as concentrações foram feitas em triplicatas. Após aplicação do tratamento,

as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, o meio foi descartado, as células lavadas duas vezes com PBS e adicionado um novo meio contendo a Citocalasina-B, numa concentração final de 3,5 µg/mL e incubadas por mais 24 horas. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, coletadas, tratadas com solução hipotônica (0,075 M KCl, 4°C, 3 minutos) e fixadas com metanol e ácido acético (9:1). Após esse processo, as lâminas foram coradas com solução de Giemsa 5% por 8 minutos, e colocadas para secar em temperatura ambiente.

Para análise, foram contadas 1000 células binucleadas por cada experimento em um aumento de 400x. Foram contadas 500 células viáveis em cada concentração por experimento para determinar o índice de divisão nuclear (NDI) (Eastmond & Tucker, 1989). O número de micronúcleos em células binucleadas foi determinado seguindo o critério de identificação publicado por Fenech (2007).

Os dados foram analisados através do software SPSS v.20 utilizando os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, com o nível de significância estabelecido em $p < 0,05$. O experimento foi realizado triplicata e repetido três vezes independentemente.

4. RESULTADOS

4.1. Teste de Viabilidade Celular (MTT)

O teste do MTT foi realizado para investigar a viabilidade celular das células HepG2 quando tratadas com Diosgenina e Hecogenina de forma aguda. As células foram expostas a diferentes concentrações de Diosgenina durante 24 horas. Como pode ser visto na figura 8, a Diosgenina não interferiu no metabolismo mitocondrial em concentrações mais baixas quando comparadas ao controle negativo. No intervalo de concentrações entre 5 e 30 µM, o efeito no metabolismo celular se assemelha a um platô, não demonstrando muitas interferências na viabilidade celular, estando ela em torno de 100%. A partir da exposição a 40 µM de Diosgenina, as células começam a ter uma redução em seu metabolismo, que se torna significativa quando são expostas a 50 µM, comprovando um possível efeito

citotóxico da Diosgenina. Com o aumento da concentração, a viabilidade decresce significativamente, chegando próximo de 20%.

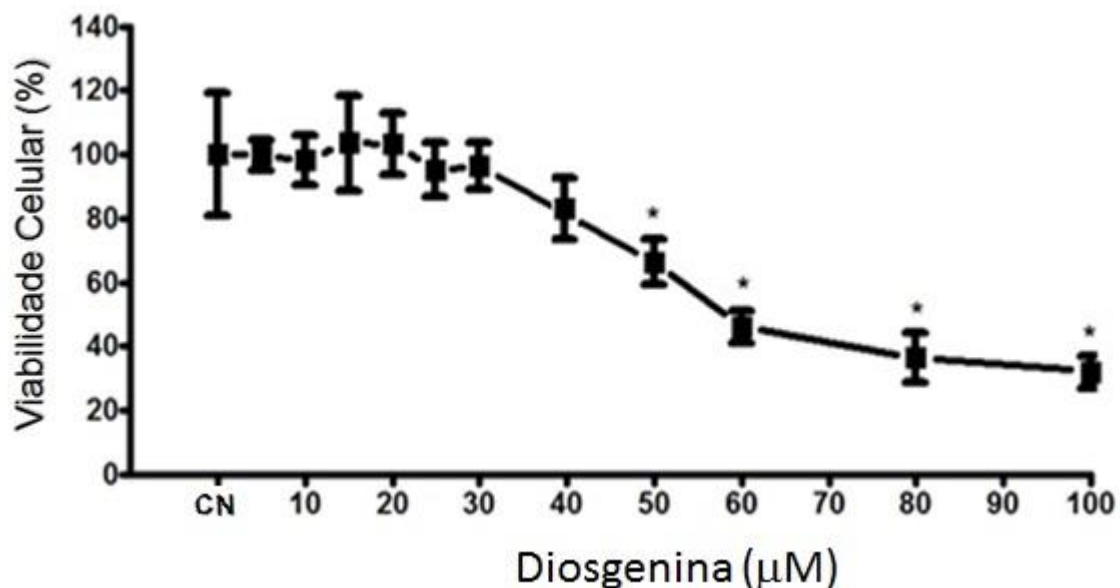


Figura 8. Efeito da exposição durante 24 horas da Diosgenina na viabilidade de células HepG2. CN: Controle negativo (meio de cultivo celular + solvente). * representa diferença significativa entre a viabilidade das células tratadas com Diosgenina e o controle negativo ($p < 0.05$).

Para avaliar a viabilidade celular, as células da linhagem HepG2 foram expostas à diferentes concentrações de Hecogenina durante 24 horas. Como pode ser visto na figura 9, a viabilidade celular não é alterada quando as células são tratadas com concentrações de Hecogenina até 100 µM, estando sempre próxima a 100%. A partir do tratamento com 150 µM começa a haver uma redução significativa na viabilidade das células HepG2, que reduz abaixo de 80% apenas no tratamento com 200 µM de Hecogenina.

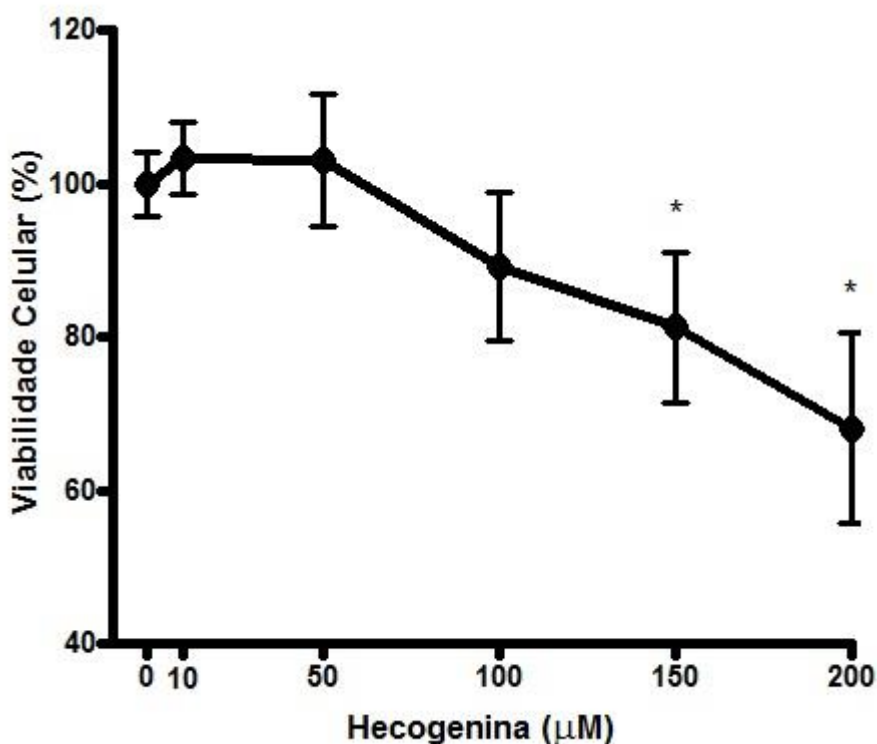


Figura 9. Efeito da exposição durante 24 horas da Hecogenina na viabilidade de células HepG2. CN: Controle negativo (meio de cultivo celular + solvente). * representa diferença significativa entre a viabilidade das células tratadas com Hecogenina e o controle negativo ($p < 0.05$).

4.2. Ensaio Clonogênico

O ensaio Clonogênico é um bom parâmetro para a triagem de atividade citotóxica de qualquer substância. Nele, concentrações citotóxicas da substância podem atrapalhar no metabolismo celular, impedindo seu crescimento e proliferação. Esse teste foi utilizado para verificar a citotoxicidade da exposição por um longo período (14 dias) de células HepG2 à Diosgenina. A figura 10 mostra um gráfico que relaciona a concentração da exposição com o crescimento celular. Foi observado que, em 14 dias, exposições a 40 µM, 80 µM e 100 µM inibem significativamente o crescimento de células HepG2. Na figura 11A–D é mostrada a redução significativa das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) causadas pelo tratamento com a Diosgenina.

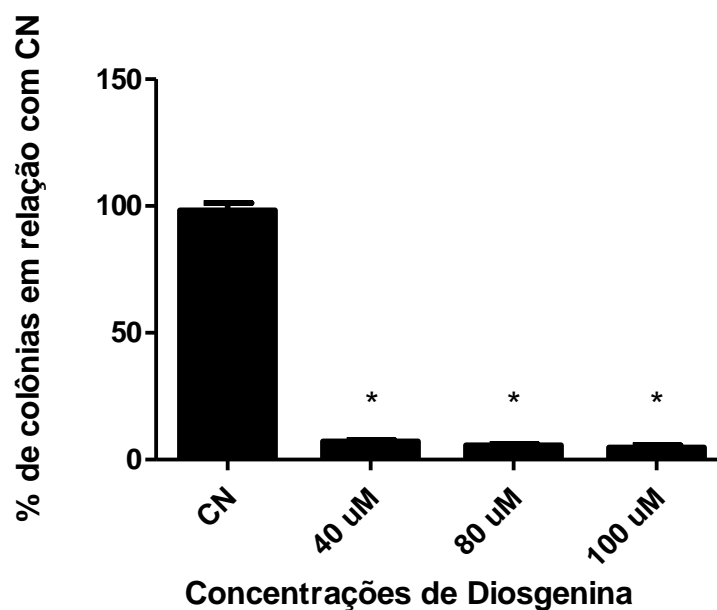


Figura 10. Representação gráfica da contagem de colônias após 14 dias de tratamento com Diosgenina. CN: Controle Negativo (células expostas ao meio + solvente). *: Diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle negativo ($p < 0,05$).

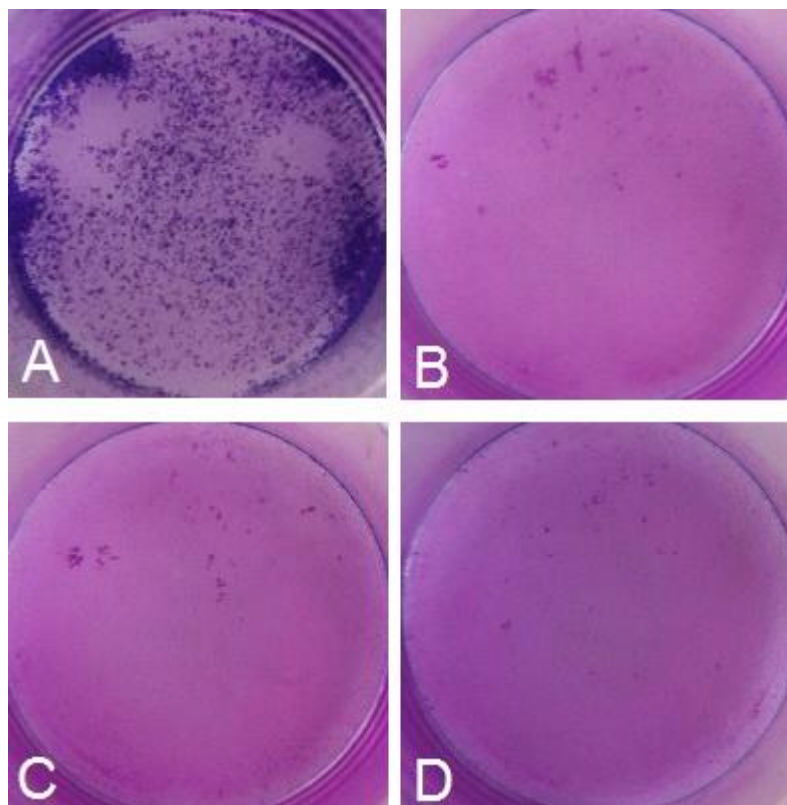


Figura 11. Ensaio clonogênico em células HepG2 tratadas com Diosgenina. (A) Controle negativo: meio de cultivo celular + solvente; (B) 40 μM ; (C) 80 μM e (D) 100 μM de Diosgenina.

4.3. Ensaio Cometa

O dano no DNA causado pela Diosgenina e Hecogenina foi medido através do ensaio cometa. As células foram caracterizadas em classes de 0 (sem dano) a 4 (dano máximo) (Collins *et al.*, 2008), como visto na figura 12A–E. Foi visualizada uma indução estatisticamente significativa de dano ao DNA quando as células foram expostas à 40 μM de Diosgenina e concentrações mais altas (tabela 3). O dano causado nessas concentrações se aproximou do nível de dano causado pelo controle positivo. Na menor concentração testada, 20 μM , a Diosgenina não foi capaz de induzir danos significativos ao material genético das células.

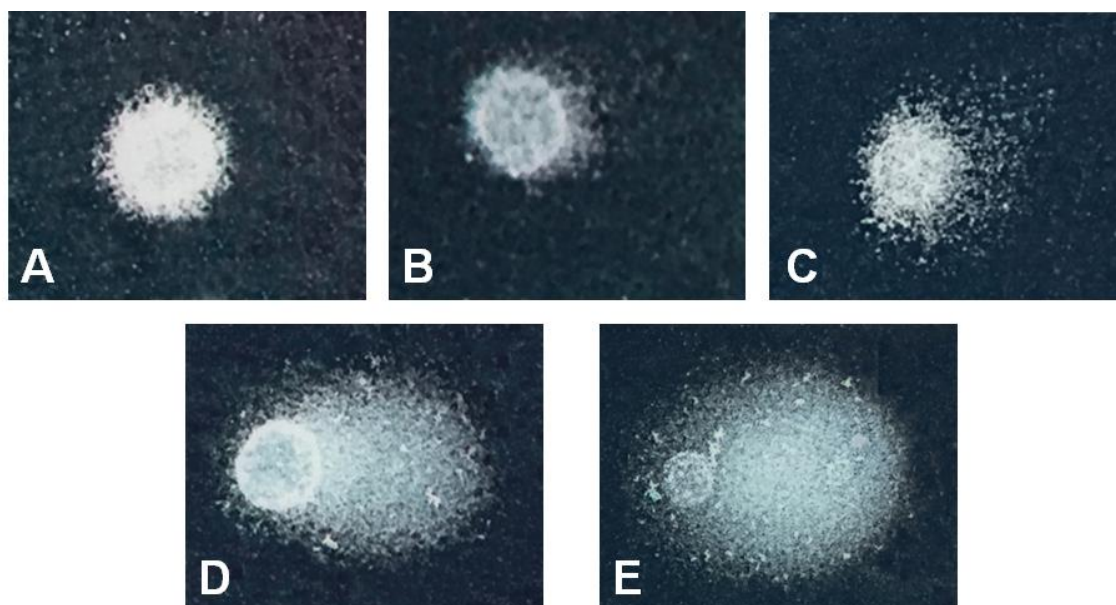


Figura 12. Representação das classes de dano ao DNA observadas usando o ensaio cometa. Cada foto representa uma unidade arbitrária de 0 a 4. (A) classe 0 – células intactas; (B) classe 1; (C) classe 2; (D) classe 3; (E) classe 4 – células com o máximo de dano (400x, aumento final). Fonte: Acervo pessoal.

Tabela 3. Ensaio cometa em células HepG2 expostas a diferentes concentrações de Diosgenina.

Tratamentos	Número de células em cada classe de cometa					Total de Dano (média±SD)
	Categorias de migração (média±SD)					
	0	1	2	3	4	
CN	30 ± 6.4	16 ± 2.9	2 ± 1.6	1 ± 0.5	1 ± 0.5	23 ± 7.9
CP	0 ± 0.0*	0 ± 0.0*	8 ± 3.5*	23 ± 4.3*	19 ± 1.4*	171 ± 17*
20 µM	30 ± 3.7	11 ± 5.2	3 ± 1.6	4.3 ± 2.9	1.7 ± 1.3	36 ± 5.5
40 µM	0.7 ± 0.5*	7.7 ± 1.2*	11.7 ± 1.2*	11.2 ± 0.5*	18.7 ± 1.2*	140 ± 3.4*
60 µM	0 ± 0.0*	5.7 ± 2.5*	13.3 ± 2.9*	15.3 ± 2.5*	15.7 ± 1.7*	141 ± 3.3*

CN: Controle Negativo (meio de cultivo celular + solvente); CP: Controle Positivo (30µM H₂O₂). * representa diferença estatisticamente significativa entre a viabilidade das células tratadas com Diosgenina e o controle negativo (p<0.05).

O ensaio cometa, realizado para investigar o dano ao DNA de células tratadas com Hecogenina, mostrou que todas as concentrações não-citotóxicas testadas são capazes de causar dano no DNA (Tabela 4). Foi observado um aumento estatisticamente significativo de dano ao DNA em todos os tratamentos realizados

com a Hecogenina, e um aumento significativo de nucleóides pertencentes à classe 2 e 4 de dano.

Tabela 4. Ensaio cometa em células HepG2 expostas a diferentes concentrações de Hecogenina.

Tratamentos	Número de células em cada classe de cometa					Total de Dano (média±SD)
	Categorias de migração (média±SD)					
	0	1	2	3	4	
CN	25.7 ± 1.2	19 ± 2.2	2.3 ± 0.5	2 ± 1.4	1 ± 0.0	33.7 ± 2.5
CP	0 ± 0.0*	0 ± 0.0*	9 ± 3.5*	23 ± 4.3*	18 ± 1.3*	159 ± 17*
10 µM	19.3 ± 1.7*	13.3 ± 0.5*	6.3 ± 0.9*	4.7 ± 1.2	6.4 ± 0.5*	65.3 ± 3.4*
25 µM	16 ± 1.4*	20.8 ± 2.7	4.7 ± 1.2*	4 ± 1.4	4.5 ± 0.7*	56.7 ± 9.3*
50 µM	15.3 ± 1.7*	16.3 ± 3.4	7.3 ± 2.9*	5 ± 2.8	6 ± 2.8*	70 ± 4.9*

CN: Controle Negativo (meio de cultivo celular + solvente); CP: Controle Positivo (30µM H₂O₂). * representa diferença estatisticamente significativa entre a viabilidade das células tratadas com Hecogenina e o controle negativo (p<0.05).

4.4. Ensaio CBMN

O ensaio CBMN foi utilizado para avaliar o potencial mutagênico da Diosgenina e Hecogenina por meio da identificação de biomarcadores como os micronúcleos (MNs), brotos nucleares (NBUD) e pontes nucleoplasmáticas (NBRD) nas células binucleadas (Figura 13).

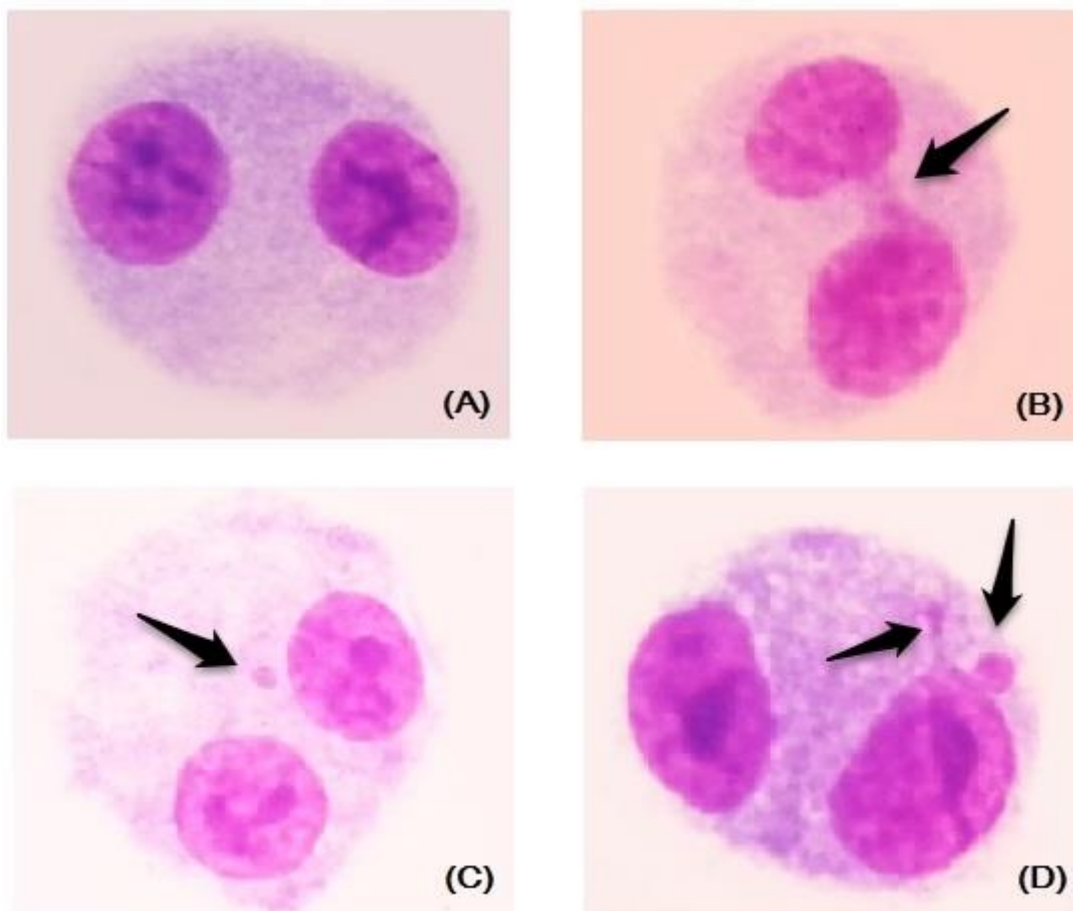


Figura 13. Parâmetros analisados no ensaio CBMN. (A) Célula binucleada sem anormalidades nucleares; (B) Célula binucleada com ponte nucleoplasmática (seta); (C) Célula binucleada com micronúcleo (seta); (D) Célula binucleada com brotos nucleares (seta). Fonte: Acervo Pessoal.

Na figura 14 pode-se observar o efeito citotóxico e mutagênico da Diosgenina. O efeito citotóxico pode ser observado através da redução significativa do Índice de Divisão Nuclear (NDI) a partir da exposição a 40 μM de Diosgenina. Estes valores de NDI indicam que as células tiveram uma diminuição em sua taxa metabólica e conseqüente redução na capacidade de se multiplicar, diminuindo a quantidade de células multinucleadas, indicando um efeito citostático.

Apesar de ser observado efeito citostático na concentração de 40 μM , não foi observado um aumento significativo da frequência de micronúcleos. Somente foi visualizada uma frequência aumentada neste parâmetro quando as células foram expostas a 50 μM de Diosgenina (figura 14). A frequência de brotos nucleares e pontes nucleoplasmáticas não foi alterada com os tratamentos de Diosgenina.

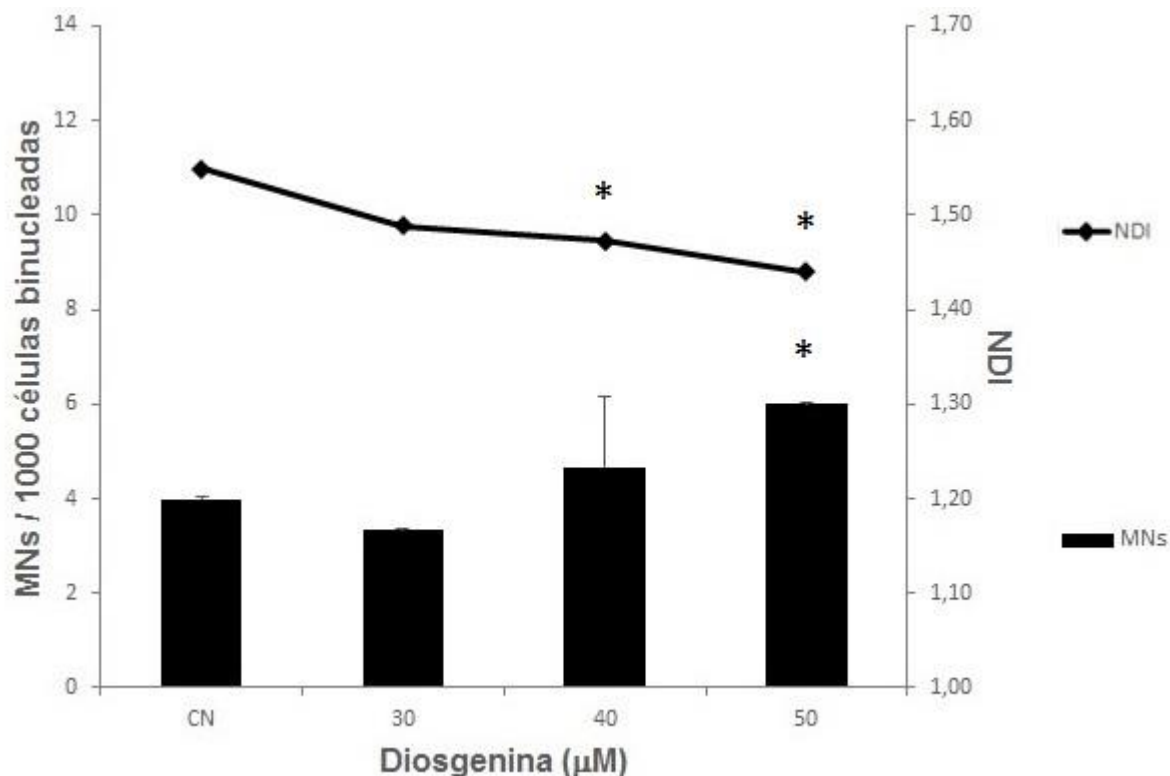


Figura 14. Efeito mutagênico da Diosgenina em células HepG2. As barras representam os micronúcleos, e os pontos, o NDI. Os resultados são mostrados como média \pm SD do número de MNs por 1000 células binucleadas de três experimentos diferentes. CN: controle negativo (meio de cultivo celular + solvente); CP: ciclofosfamida 0,2 mg/mL. * representa diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e o seu controle negativo referente a cada parâmetro ($p < 0,05$).

O resultado do CBMN com a Hecogenina é apresentado na figura 15. O tratamento com 25 μ M e 50 μ M de Hecogenina foi capaz de reduzir significativamente o NDI, revelando forte efeito citostático. Além disso, foi observada uma redução na frequência de micronúcleos e brotos nucleares em todas as concentrações não-citotóxicas testadas. Não houve diferença significativa na quantidade de pontes nucleoplasmáticas observadas.

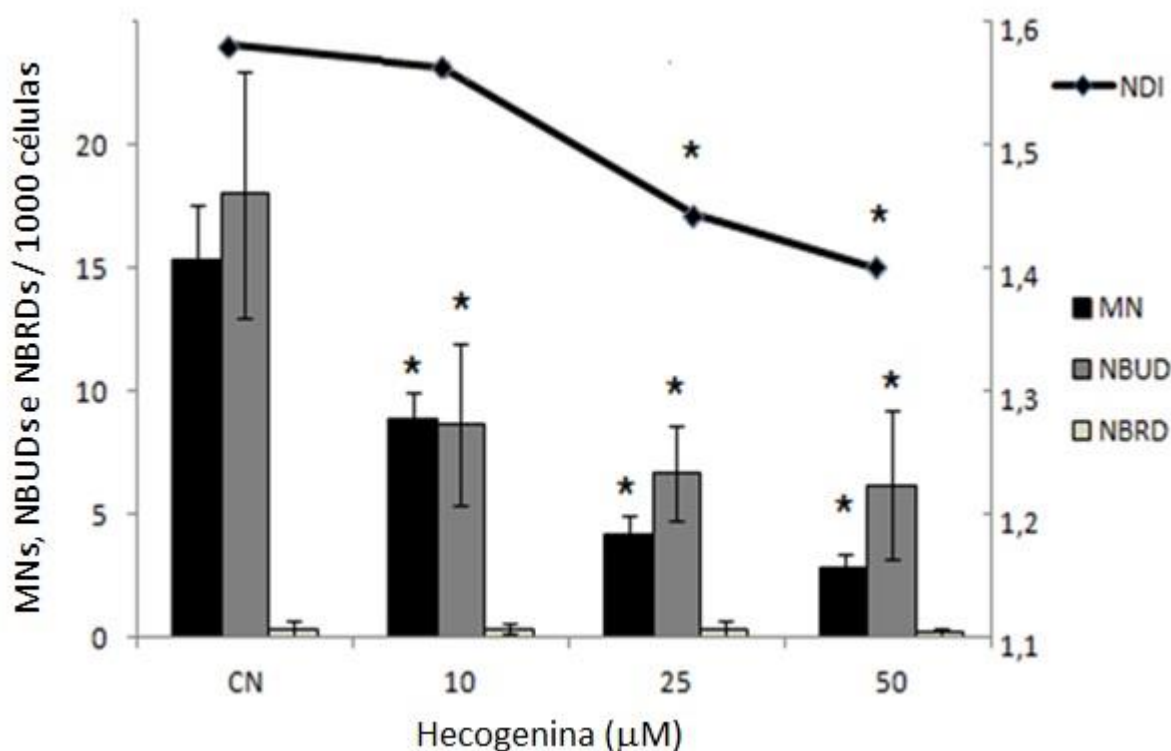


Figura 15. Efeito da Hecogenina na indução de MN (barras) e NDI (pontos) em células HepG2. Os resultados são mostrados como média \pm SD do número de MNs por 1000 células binucleadas de três experimentos diferentes. CP: ciclofosfamida 0,2 mg/mL. * representa diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e o seu controle negativo referente a cada parâmetro ($p < 0.05$).

5. DISCUSSÃO

Compostos naturais são amplamente utilizados pela indústria farmacêutica para a produção semissintética de medicamentos, além de também serem empregados por várias populações como agentes terapêuticos (Cragg; Grothaus; Newman, 2014; Rokaya *et al.*, 2014). Dentre esses produtos naturais, destacam-se as sapogeninas com uma ampla variedade de atividades biológicas. A Diosgenina e a Hecogenina são sapogeninas esteroidais que apresentam atividades biológicas importantes, encontradas em plantas do gênero *Dioscorea* e *Agave*, respectivamente, sendo utilizadas tanto de forma caseira para o tratamento de doenças, como industrialmente para a semissíntese de hormônios e anti-inflamatórios esteroidais (Raskin *et al.*, 2002; Dias *et al.*, 2007; Eskander; Lavaud; Harakat, 2010; Peng *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2012; Serafini *et al.*, 2012). A

investigação da toxicidade destes produtos naturais é recente (Lee *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2012; He *et al.*, 2015), entretanto não há registros acerca da toxicidade genética destas sapogeninas e considerando a sua relevância farmacológica, este estudo teve como objetivo investigar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico da Diosgenina e da Hecogenina, em células de hepatócitos humanos, empregando testes de referência na análise destes parâmetros.

Para traçar o perfil tóxico-genético de uma determinada substância, ensaios de citotoxicidade compõem a primeira etapa dentro deste processo de investigação. Um ensaio amplamente utilizado para verificar a viabilidade celular é o teste do MTT. No presente estudo, foram observados efeitos citotóxicos em células HepG2 quando expostas a concentrações acima de 30 μM de Diosgenina, e também quando expostas a concentrações iguais ou maiores que 150 μM de Hecogenina.

Considerando a Diosgenina, a viabilidade celular foi reduzida significativamente a partir de 50 μM , de uma forma dose-dependente. Adicionalmente ao MTT, foi realizado para esta sapogenina o ensaio clonogênico que também confirmou o potencial citotóxico da Diosgenina por meio de uma redução significativa na formação de UFCs em células HepG2 expostas a um longo período de tempo (14 dias). Esta resposta citotóxica pode ser justificada pela interferência da Diosgenina no ciclo celular, que desencadeia uma cascata de processos apoptóticos como demonstrados em estudos recentes.

Li *et al.* (2015) constataram que a Diosgenina induz uma parada no ciclo celular entre as fases G2/M promovendo a apoptose em células HepG2 expostas a 40 μM por 24 horas. De acordo com esse estudo, existe um aumento de células apoptóticas proporcional ao aumento de concentração de Diosgenina, avaliadas por meio do ensaio de coloração por FITC/ligado a Anexina V/PI em citometria de fluxo. Os autores revelaram que o mecanismo de apoptose ativado pela Diosgenina são aqueles relacionados com a ativação da cascata de caspases -3, -8 e -9, sem afetar os níveis de Bcl-2 e Bax. Além disso, a parada no ciclo celular também foi vista por meio de citometria de fluxo em células HepG2 corada com PI, revelando um aumento dependente de concentração em células estacionadas entre as fases G2/M do ciclo celular. O padrão apoptótico da exposição à Diosgenina também já tinha sido observado por Kim *et al.* (2012). Os dados provenientes deste estudo apontam

a promoção da apoptose como a causa da citotoxicidade observada na linhagem HepG2 tratada com 40 μ M por 24 horas.

Por outro lado, há uma escassez de dados relativos à Hecogenina indicando a importância de estudos que elucidem os mecanismos de ação e as consequências da exposição a esta sapogenina. Dentre os poucos estudos, podemos destacar o de Liagre *et al.* (2007) que mostraram o efeito citotóxico da Hecogenina, a partir do teste de MTT, em linhagem celular de sinoviócitos humanos expostas a 40 μ M, por 24 horas. Adicionalmente, Trouillas *et al.* (2005) demonstraram o efeito citotóxico nessa mesma concentração e tempo em células de osteossarcoma 1547 humano. Entretanto, quando se compara estes dados com o presente estudo, observa-se que a Hecogenina foi citotóxica em concentrações maiores que as mencionadas. Esta diferença pode ser explicada considerando as distintas linhagens celulares utilizadas. A célula utilizada na presente pesquisa, HepG2, apresenta a capacidade endógena de biotransformação, o que pode ajudar a reduzir a toxicidade de diferentes xenobióticos. A linhagem HepG2 vem sendo amplamente utilizada com sucesso para a triagem de mutágenos devido a sua eficiência na metabolização (Uhl *et al.*, 2000; Knasmüller *et al.*, 2004; Chiang *et al.*, 2011). Maisanaba *et al.* (2015) observaram que o carvacrol, um produto natural extraído de óleos essenciais presentes em plantas, teve sua toxicidade reduzida quando biotransformado, apresentando um efeito mutagênico avaliado pelo ensaio CBMN em células de linfoma de ratos (L5178Y/*Tk*[±]) apenas quando testadas sem a fração S9 que confere a capacidade de metabolização para estas células. Por isso, o processo de biotransformação realizado pelas células HepG2 pode explicar a diminuição da toxicidade da Hecogenina observada nesse estudo.

O próximo passo desta investigação foi a realização de ensaios de genotoxicidade e de mutagenicidade na tentativa de se detectar possíveis interações destas sapogeninas com o material genético. A relevância destes testes está centrada na falta de informações acerca das características tóxico-genéticas de compostos já utilizados na indústria e na medicina tradicional, como a Diosgenina e a Hecogenina. Mesmo que os usos já sejam amplamente difundidos, a ausência destes dados pode implicar em prejuízos à saúde da população. De fato, muitas substâncias com amplo espectro de uso foram diagnosticadas como genotóxicas. Um exemplo é o estudo realizado por Chequer *et al.* (2012) que relataram o

potencial genotóxico e mutagênico da Erythrosina, um corante alimentício aprovado pela FDA (USA Food and Drug Administration). Neste trabalho foram utilizados os ensaios Cometa e CBMN em células HepG2 e mesmo em baixas concentrações este produto natural induziu um aumento na frequência de danos do DNA e de micronúcleos.

Considerando as saponinas – alvo da presente pesquisa – as suas propriedades tóxico-genéticas já foram estudadas em diferentes linhagens celulares (Liu *et al.* 2011; Munari *et al.* 2012; Mahon *et al.*, 2014). Entretanto, até o momento, não há dados sobre a toxicidade genética da Diosgenina e da Hecogenina, reforçando a relevância e o impacto deste estudo. Além disso, a escolha dos ensaios empregados está relacionada ao fato de que o Teste Cometa e o Ensaio CBMN vêm sendo amplamente utilizados para identificar, respectivamente, o potencial genotóxico e mutagênico de xenobióticos (Scolastici *et al.*, 2008; Zou *et al.*, 2009; Hoshina *et al.*, 2013; Cilião *et al.*, 2015; Gajski *et al.*, 2015).

A partir das análises provenientes da atual pesquisa, a Diosgenina e a Hecogenina foram capazes de induzir danos ao DNA, entretanto, um aumento significativo na frequência de micronúcleos, foi observado apenas na maior concentração testada de Diosgenina. Portanto, a Diosgenina foi diagnosticada como genotóxica e mutagênica, enquanto que a Hecogenina tem um potencial genotóxico. É a primeira vez que um estudo demonstra esta particularidade relativa ao mecanismo de ação destas saponinas.

Um ponto importante a ser considerado é que a Dioscina, precursor natural da Diosgenina, foi caracterizado como genotóxico para uma linhagem celular tumoral de pulmão (Wei *et al.*, 2013). Esses autores verificaram a genotoxicidade da Dioscina por meio do ensaio cometa, em concentrações de 2.5, 5.0 e 10 $\mu\text{g/mL}$, e pelo ensaio Tunel e análise do ciclo celular, ambos na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, eles relataram propriedades pró-apoptóticas da Dioscina através da detecção da liberação de enzimas do citocromo C no citosol, aumento da atividade das caspases -3 e -9, aumento da expressão de Bax, Bak e Bid e diminuição da expressão de Bcl-2 e Bcl-xl em tratamentos com 2,5, 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de Dioscina por 48 horas.

A partir do achado que a Diosgenina também apresenta uma propriedade genotóxica, pode-se inferir que o efeito genotóxico causado pela Dioscina é devido a presença da região aglicona (Diosgenina) em sua estrutura. Por meio dos resultados obtidos neste estudo, relacionados ao Teste Cometa, foi possível observar que esta saponina foi capaz de induzir um aumento na proporção de células de classe 4. Este incremento pode estar relacionado com o processo de apoptose, uma vez que esta classe de cometa apresenta caudas longas e com grande conteúdo de DNA somada a presença de cabeças pequenas e puntiformes, como visto na figura 11E (Tice *et al.*, 2000). Este achado reforça a hipótese que o mecanismo de ação toxicológica da Diosgenina está relacionado a interferência no ciclo celular, o que poderia promover o processo de apoptose.

A capacidade das saponinas de causarem dano no DNA já foi identificada em alguns estudos. Por exemplo, Liu *et al.* (2011) demonstraram um aumento na frequência de dano no DNA em linhagem de células de ovário de hamster chinês (CHO) induzido por uma mistura de saponinas extraídas de plantas do gênero *Nuclea*, amplamente utilizadas na medicina tradicional Africana.

Quanto à Hecogenina, também foi observado um potencial genotóxico, para as três concentrações testadas. O aumento maior foi na quantidade de nucleóides classificados como pertencentes a classe 2 e 4. Entretanto, esta capacidade de induzir dano no DNA, não refletiu na sua potencialidade como um agente mutagênico, uma vez que não foi observado um aumento na frequência dos marcadores analisados por meio do Ensaio do CBMN. Porém, cabe ressaltar que a presença da Hecogenina na cultura celular levou a uma redução na frequência de micronúcleos quando comparado com o controle negativo. A partir deste comportamento pode-se inferir um possível papel como agente antimutagênico, entretanto, novos ensaios que investiguem esta potencialidade serão necessários. Este perfil genotóxico e protetor já foi evidenciado em outros estudos. Alves *et al.* (2014) descreveram que extratos de plantas ricas em saponinas podem causar dano no DNA quando analisadas isoladamente, porém, podem ter efeito protetor quando testadas juntamente com drogas mutagênicas, em modelos animais. Assim, pode-se sugerir que o dano no DNA causado pela Hecogenina está sendo efetivamente reparado, reduzindo a frequência basal de micronúcleos, provavelmente pela estimulação do sistema de reparo celular ou de outras vias celulares.

Por outro lado, a Diosgenina apresentou um comportamento distinto quando comparado a Hecogenina, já que foi capaz de induzir incrementos na frequência de micronúcleos nas células estudadas. O intervalo de concentrações da Diosgenina onde foi observado a citotoxicidade celular está de acordo com as concentrações onde foram visualizados o efeito citostático e mutagênico. A integração dessas informações sugere que o efeito tóxico da Diosgenina ocorre por meio de dano no DNA que não pode ser completamente reparado, fato que contribui para o aumento na frequência de micronúcleos e de células classe 4 contribuindo para a ativação de mecanismos apoptóticos.

Informações acerca do efeito mutagênico das saponinas são controversos. Por exemplo, um estudo publicado em 2014 por El Hosry *et al.* relatou que a Cyclamina, uma saponina isolada de plantas do gênero *Cyclamen*, induz um aumento significativo em células micronucleadas após ativação metabólica. No mesmo estudo, os autores mostraram que a Saxifragifolina B, outra saponina extraída de plantas do mesmo gênero, não induziu a formação de micronúcleos e protegeu as células de ovário de hamster chinês do efeito clastogênico da Mitomicina C. Alguns trabalhos descrevem a ausência de efeitos mutagênicos em extratos de plantas ricos em Dioscina (*Dioscorea Villosa* e feno grego), avaliados por meio de uma bateria de testes mutagênicos em mamíferos (incluindo o teste MN em eritrócitos de camundongos) e em bactérias (Flammang *et al.*, 2004; Hooker, 2004). Por outro lado, Khader, Eckl e Bresgen (2007), testaram extratos de plantas medicinais (espécies de feno grego) ricas em Dioscina e outras saponinas, em cultura de hepatócitos de ratos e encontraram um efeito mutagênico por meio do ensaio de MN. Portanto, a heterogeneidade nos resultados pode ser encontrada mesmo em plantas do mesmo gênero contendo Dioscina (e por consequência a Diosgenina) devido a composição química e a quantidade de compostos ativos presentes nesses extratos. Por isso, a importância de estudar o comportamento das substâncias isoladas, para a melhor compreensão das respostas oriundas a partir das análises de misturas complexas como os extratos de plantas.

6. CONCLUSÃO

Os produtos naturais usados tanto na medicina tradicional quanto como substratos para a indústria farmacêutica, precisam ser cuidadosamente avaliados para serem empregados como substâncias terapêuticas. A partir dos resultados provenientes desta pesquisa, foi possível caracterizar e revelar as informações acerca das propriedades tóxico-genéticas da Diosgenina e da Hecogenina.

Uma análise comparativa entre estas sapogeninas aponta para um maior risco no consumo de formulações que contenham a Diosgenina em sua composição. Essa afirmação é sustentada pela capacidade de indução de micronúcleos que são biomarcadores de instabilidade genômica. Por outro lado, a Hecogenina pode apresentar um papel protetor. Entretanto, estudos adicionais serão necessários para que se investigue uma possível atividade antimutagênica.

De fato, esta pesquisa contribui para incrementar os dados acerca das propriedades tóxico-genéticas destas sapogeninas. É a primeira vez que se observa um efeito mutagênico para a Diosgenina. Este fato ressalta a importância de se realizar diferentes ensaios com distintos parâmetros investigados e vários tipos celulares. Este conjunto de informações serve como fonte de dados para a caracterização do risco que a população está submetida ao consumir fitoterápicos que estão cada vez mais difundidos por serem de origem natural. Porém, como foi demonstrado por meio deste estudo, mesmo os produtos naturais podem ter um potencial mutagênico e requerem cautela e controle como qualquer outro fármaco.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A.B.C.R. *et al.* Genotoxic assessment of *Rubus imperialis* (Rosaceae)N extract in vivo and its potencial chemoprevention against cyclophosphamide-induced DNA damage. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 153, p. 694–700, 2014.
- AUGUSTIN, J. M. *et al.* Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. ***Phytochemistry***, v. 72, p. 435-457, 2011.
- AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. ***Archives of Toxicology***, 2013, DOI 10.1007/s00204-013-1070-0.
- BASSO, L. A. *et al.* The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis and T-cell mediated diseases: a review. ***Memórias do Instituto Oswaldo Cruz***, v. 100, p. 475-506, 2005.
- BASU, N. K. *et al.* Differential and special properties of the major human UGT1-encoded gastrointestinal UDP-glucuronosyltransferases enhance potential to control chemical uptake. ***Journal of Biological Chemistry***, v. 297, p. 1429-1441, 2004.
- BETTEGA, P. V. C. *et al.* Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. ***Archives of Oral Research***, v. 7, p. 89-97, 2011.
- BHALLI, J. A. *et al.* Evaluating the weak *in vivo* micronucleus response of a genotoxic carcinogen, Aristolochic acids. ***Mutation Research***, v. 753, p. 82-92, 2013.
- BHATTARAM, V. A. *et al.* Pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicinal products. ***Phytomedicine***, v. 9, p. 1-33, 2002.
- BIAN, D. *et al.* Effects os diosgenin on cell proliferation induced by IGF-1 in primary human thyrocytes. ***Archives of Pharmacal Research***, v. 34, p. 997-1005, 2011.
- BROWN, J.M.; ATTARDI, L.D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. ***Natural Reviews Cancer***, v. 5, p. 231–237, 2005.
- BURGESS, L. C. *et al.* Lycopene has limited effect on cell proliferation in only two of seven human cell lines (both cancerous and noncancerous) in an *in vitro* system with doses across the physiological range. ***Toxicology In Vitro***, v. 22, p. 1297-1300, 2008.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicine (phytotherapeutics agents). ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***, v. 33, p. 179-189, 2000.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 100, p. 131-134, 2005.

CAPASSO, R. *et al.* Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, p. S58-S65, 2000.

CARVALHO, M. C. *et al.* Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v 42, p. 185-191, 2003.

CERQUEIRA, G.S. *et al.* Effects of hecogenin and its possible mechanism of action on experimental models of gastric ulcer in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 683, p. 260-269, 2012.

CHALLINOR, V.L.; De VOSS, J.J. Open-chain steroidal glycosides, a diverse class of plant saponins. **Nat. Prod. Rep.**, v. 30, p. 429–454, 2013.

CHEOK, C. Y.; SALMAN, H. A. K.; SULAIMAN, R. Extraction and quantification of saponins: a review. **Food Research International**, v. 59, p. 16-40, 2014.

CHEQUER, F. M. D. *et al.* Genotoxic and mutagenic effects of erythrosine B, a xanthene food dye, on HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 3447-3451, 2012.

CHIANG, S. *et al.* Safrole-2',3'-oxide induces cytotoxic and genotoxic effects in HepG2 cells and in mice. **Mutation Research**, v. 726, p. 234-241, 2011.

CHOI, K. W. *et al.* Inhibition of TNF- α -induced adhesion molecule expression by diosgenin in mouse vascular smooth muscle cells via downregulation of the MAPK, Akt and NF- κ B signaling pathways. **Vascular Pharmacology**, v. 53, p. 273-280, 2010.

CILIÃO, H. L. *et al.* Cytotoxic and genotoxic effects of high concentrations of the immunosuppressive drugs cyclosporine and tacrolimus in MRC-5 cells. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 67, p. 179-187, 2015.

COLLINS, A.R. *et al.* The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, p. 143-151, 2008.

CORONA, G. *et al.* Hydroxytyrosol inhibits the proliferation of human colon adenocarcinoma cells through inhibition of ERK1/2 and cyclin D1. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, p. 897-903, 2009.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**, 2014 <http://dx.doi.org/10.1021/np5000796>

CRAVOTTO, G. *et al.* Phytotherapeutics: an evaluation of the potential of 1000 plants. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 35, p. 11-48, 2010.

DAS, B.C. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of 2H-benzo[b][1,4]oxazine derivatives as hypoxia targeted compounds for cancer therapeutics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 4204-4206, 2009.

- DIAS, K. L. G. *et al.* Mechanisms involved in the vasodilator effect induced by diosgenin in rat superior mesenteric artery. **European Journal of Pharmacology**, v. 574, p. 172-178, 2007.
- EASTMOND, D.A., TUCKER, J.D. Kinetochore localization in micronucleated cytokinesis-blocked Chinese hamster ovary cells: a new and rapid assay for identifying aneuploidy-inducing agents. **Mutation Research**, v. 224, p. 517–525, 1989.
- EGITO, L. C. M. *et al.* Use of native species *Crenicichla menezesi* (Ariidae) as a model of *in situ* evaluation of genotoxicity in surface water. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 6042-6046, 2010.
- EL HOSRY, L. *et al.* *In vitro* cytotoxic and anticlastogenic activities of saxifragifolin B and cyclamin isolated from *Cyclamen persicum* and *Cyclamen libanoticum*. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, p. 1134-1140, 2014.
- ESKANDER, J., LAVAUD, C., HARAKAT, D. Steroidal saponins from the leaves of *Agave macroacantha*. *Fitoterapia*, v. 81, p. 371–374, 2010.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1084-1104, 2007.
- FENECH, M. *et al.* Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, p. 125-132, 2011.
- FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.
- FIKROVÁ, P. *et al.* Application of the comet assay method in clinical studies. **Wiener Klinische Wochenschrift.**, v. 123, p. 693–699, 2011.
- FLAMMANG, A.M. *et al.* Genotoxicity testing of a fenugreek extract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1769–1775, 2004.
- FRANKEN, N.A.P. *et al.* Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nature Protocols*, v. 1, p. 2315-2319, 2006.
- FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MACKEY, B. E. Effect of feeding solanidine, solasodine and tomatidine to non-pregnant and pregnant mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 61-71, 2003.
- GAJSKI, G. *et al.* Genotoxic potential of selected cytostatic drugs in human and zebrafish cells. **Environmental Science and Pollution Research**, 2015. DOI: 10.1007/S11356-015-4592-6.
- GAMA, K. B. *et al.* Evidence for the involvement of descending pain-inhibitory mechanisms in the antinociceptive effect of hecogenin acetate. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 559-563, 2013.

GAO, M. *et al.* Diosgenin down-regulates NF- κ B p65/p50 and p38MAPK pathways and attenuates acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. **International Immunopharmacology**, v. 15, p. 240-245, 2013.

GONÇALVES, A. L. M. *et al.* Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. in different cells of mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 740-745, 2012.

GONDIN, K. L. Avaliação da atividade cardiovascular de fitoestrógenos e caracterização do mecanismo de ação da diosgenina em ratos. **Tese de doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**, Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Brasil, 2006.

HARTMANN, A. *et al.* Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, p. 45-51, 2003.

HASHIZUME, T. *et al.* Identification of human UDP-glucuronosyltransferases catalyzing hepatic 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ conjugation. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, p. 1240-1250, 2008.

HE, H. *et al.* Steroidal Saponins from *Paris polyphylla* Induce Apoptotic Cell Death and Autophagy in A549 Human Lung Cancer Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, p. 1169–1173, 2015.

HIGDON, K. *et al.* The use of estrogen, DHEA, and diosgenin in a sustained delivery setting as a novel treatment approach for osteoporosis in the ovariectomized adult rat model. **Biomed. Sci. Instrum.**, v. 37, p. 281-286, 2001.

HIRAI, S. *et al.* Diosgenin attenuates inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, p. 797-804, 2010.

HOOKER, E. Final report of the amended safety assessment of *Dioscorea Villosa* (Wild Yam) root extract. **International Journal of Toxicology**, v. 23, p. 49–54, 2004.

HOSHINA, M. M. *et al.* Cytotoxic, genotoxic/antigenotoxic and mutagenic/antimutagenic effects of the venom of the wasp *Polybia paulista*. **Toxicon**, v. 72, p. 64-70, 2013.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Chemistry and pharmacology of natural products – Saponins. Cambridge: **Cambridge University Press**, 1995.

HU, M. *et al.* Cytotoxicity of dioscin in human gastric carcinoma cells through death receptor and mitochondrial pathways. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, p. 712–722, 2012.

ICH, 2011. Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use S2 (R1). In: **International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**.

- JAYACHANDRAN, K. S.; VASANTHI, H. R.; RAJAMANICKAM, G. V. Antilipoperoxidative and membrane stabilizing effect of diosgenin in experimentally induced myocardial infarction. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 327, p. 203-210, 2009.
- JIM, X. *et al.* Investigation of quinocetone-induced genotoxicity in HepG2 cells using the comet assay, cytokinesis-block micronucleus test and RAPD analysis. **Toxicology In Vitro**, v. 23, p. 1209-1214, 2009.
- JORDAN, S.A., CUNNINGHAM, D.G., MARLES, R.J. Assessment of herbal medicinal products: challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 243, p. 198–216, 2010
- JUAREZ-OROPEZA, M. A.; DIAZ-ZAGOYA, J. C.; RABINOWITZ, J. L. In vivo and in vitro studies of hypocholesterolemic effects of diosgenin in rats. **International Journal of Biochemistry**, v. 19, p. 679-683, 1987.
- JUNG, D. H. *et al.* Diosgenin inhibits macrophage-derived inflammatory mediators through downregulation of CK2, JNK, NF-kappaB and AP-1 activation. **International Immunopharmacology** v. 10, p. 1047-1054, 2010.
- KHADER, M., ECKL, P.M., AND BRESGEN, N. Effects of aqueous extracts of medicinal plants on MNNG-treated rat hepatocytes in primary cultures. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 199–202, 2007.
- KIM, D.S. *et al.* Diosgenin induces apoptosis in HepG2 cells through generation of reactive oxygen species and mitochondrial pathway. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.
- KNASMÜLLER, S. *et al.* Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. **Toxicology**, v. 198, p. 315–328, 2004.
- KOSMIDER, B. *et al.* Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt (II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. **Mutation Research**, v. 563, p. 61–70, 2004.
- KWON, C. S. *et al.* Anti-obesity effect of *Discorea nipponica* Makino with lipase-inhibitory activity in rodents. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, p. 1451-1456, 2003.
- LASA, M. *et al.* Dexamethasone causes sustained expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase-1 and phosphatase-mediated inhibition of MAPK p38. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, p. 7802-7811, 2002.
- LEANDRO, L. F. *et al.* Assessment of genotoxicity and antigenotoxicity of (+)-usnic acid in V79 cells and Swiss mice by the micronucleus and comet assays. **Mutation Research**, v. 753, p. 101-106, 2013.

- LEE, J. *et al.* Diosgenin inhibits melanogenesis through the activation of phosphatidylinositol-3-kinase pathway (PI3K) signaling. **Life Sciences**, v. 81, p. 249-254, 2007.
- LEE, K. *et al.* Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2832-2839, 2004.
- LI, Y. *et al.* Diosgenin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. **Oncology Reports**, v. 33, p. 693–698, 2015.
- LIAGRE, B. *et al.* Diosgenin, a plant steroid, induces apoptosis in human rheumatoid arthritis synoviocytes with cyclooxygenase-2 overexpression. **Arthritis Research & Therapy**, v. 6, p. 373-383, 2004.
- Liagre, B. *et al.* Inhibition of human rheumatoid arthritis synovial cell survival by hecogenin and tigogenin is associated with increased apoptosis, p38 mitogen-activated protein kinase activity and upregulation of cyclooxygenase-2. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 20, p. 451–460, 2007.
- LIU, M. *et al.* Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with disruption of Ca²⁺ homeostasis. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 55, p. 79-90, 2005.
- LIU,W. *et al.* Genotoxic and clastogenic activity of saponins extracted from *Nauclea* bark as assessed by the micronucleus and the comet assays in Chinese Hamster Ovary cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 176–183, 2011.
- MAHON, C.P.C. *et al.* Toxicological evaluation of the hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 665–671, 2014.
- MAISANABA, S. *et al.* In vitro genotoxicity testing of carvacrol and thymol using the micronucleus and mouse lymphoma assays. **Mutation Research**, v. 784-785, p. 37-44, 2015.
- MANIVANNAN, J. *et al.* Diosgenin attenuates vascular calcification in chronic renal failure rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 378, p. 9–18, 2013.
- MARCUSSI, S. *et al.* Genotoxic effect of Bothrops sane venoms and isolated toxins on human lymphocyte DNA. **Toxicon**, v. 65, p. 9-14, 2013.
- McANUFF, M. A. *et al.* Hypoglycemic effects of steroidal saponins isolated from Jamaican bitter yam, *Discorea polygonoides*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 1667-1672, 2005.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

- MUNARI, C.C. *et al.* Evaluation of cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of *Solanum lycocarpum* fruits glicoalkaloid extract in V79 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 3696–3701, 2012.
- NADIN, S.B., VARGAS-ROIG, L.M., CIOCCA, D.R. A silver staining method for single-cell gel assay. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 49, p. 1183-1186, 2001.
- NGO, L. T.; OKOGUN, J. I.; FOLK, W. R. 21st Century natural products research and drug development and traditional medicines. **Nat. Prod. Rep.**, v. 30, p. 584-592, 2013.
- NIKOLOFF, N. *et al.* Comparative study of cytotoxic and genotoxic effects induced by herbicide S-metolachlor and its commercial formulation Twin Pack Gold® in human hepatoma (HepG2) cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 777-781, 2013.
- NIKOLOFF, N.; LARRAMENDY, M. L.; SOLONESKY, S. Assessment of DNA damage, cytotoxicity, and apoptosis in human hepatoma (HepG2) cells after flurochloridone herbicide exposure. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 233-241, 2014.
- OECD, 1997. Genetic Toxicology: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, Organization for Economic Co-operation and Development. OECD, Paris.
- OECD, 2007. In Vitro Micronucleus Test, **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, Organization for Economic Co-operation and Development. OECD, Paris.
- OMS, 2013. **WHO Traditional Medicine Strategy: 2014-2023**. World Health Organization. URL: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/en/ (acessado em 25/05/2015)
- OSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, p. 291–298, 1984.
- PABÓN, A. *et al.* Diosgenone synthesis, anti-malarial activity and QSAR of analogues of this natural product. **Molecules**, v. 18, p. 3356-3378, 2013.
- PAIK; S. Y. *et al.* The essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* pericarp induce apoptosis of HepG2 human hepatoma cells through increased production of reactive oxygen species. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 802–807, 2005.
- PATEL, K. *et al.* A review on pharmacological and analytical aspects of diosgenin: a concise report. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 2, p. 46-52, 2012.
- PEANA, A. T. *et al.* Anti-inflammatory activity of aqueous extracts and steroidal saponinins of *Agave americana*. **Planta Medica**, v. 63, p. 199-202, 1997.

- PENG, Y. *et al.* Pathway for the steroidal saponins conversion to diosgenin during acid hydrolysis of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, p. 2620-2625, 2011.
- PETTA, T. B. *et al.* Genotoxicity induced by saponified coconut oil surfactant in prokaryote systems. **Mutagenesis**, v. 19, p. 441-444, 2004.
- RAJU, J.; BIRD, R. P. Diosgenin, a naturally occurring furostanol saponin suppress 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase expression and induces apoptosis in HCT-116 human colon carcinoma cells. **Cancer Letters**, p. 194-204, 2007.
- RAO, B. S. S.; Sreedevi, M. V.; Rao, B. N. Cytoprotective and antigenotoxic potential of Mangiferin, a glucosylxanthone against cadmium chloride induced toxicity in HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 592-600, 2009.
- RASKIN, I. *et al.* Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, v. 20, p. 522–531, 2002.
- ROKAYA, M.B. *et al.* Traditional uses of medicinal plants in gastrointestinal disorders in Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, p. 221–229, 2014.
- SANTOS, P. E. *et al.* Genotoxicity induced by *Eugenia caryophyllata* infusion. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, v. 71, p. 439-444, 2008.
- SCOLASTICI, C. *et al.* Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. **Toxicology in vitro**, v. 22, p. 510-514, 2008.
- SERAFINI, M. R. *et al.* Mapeamento de tecnologias patenteáveis com o uso da hecogenina. **GEINTEC**, v. 2, p. 427-435, 2012.
- SINGH, N.P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175 p. 184–191, 1988.
- SONG, J. X. *et al.* Diosgenin reduces leukocytes adhesion and migration linked with inhibition of intercellular adhesion molecule-1 expression and NF- κ Bp65 activation in endothelial cells. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, p. 142-149, 2012.
- SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; Van STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 219-243, 2004.
- TADA, Y. *et al.* Novel effects of diosgenin on skin aging. **Steroid**, v. 74, p. 504-511, 2009.
- TICE, R.R. *et al.* Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.
- TROUILLAS, P. *et al.* Structure-function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modeling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1141-1149, 2005.

- TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 291-306, 2006.
- UHL, M.; HELMA, C.; KNASMÜLLER, S. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cells. **Mutation Research**, v. 468, p. 213-225, 2000.
- VARELA-BARCA, F. N.; AGNEZ-LIMA, L. F.; MEDEIROS, S. R. Base excision repair pathway is involved in the repair of lesions generated by flavonoid-enriched fractions of pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) stem bark. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 48, p. 672-681, 2007.
- VASQUEZ, M. I. *et al.* Chronic ecotoxic effects to *Pseudomonas putida* and *Vibrio fischeri*, and cytostatic and genotoxic effects to the hepatoma cell line (HepG2) of ofloxacin photo(cata)lytically treated solutions. **Science of the Total Environment**, v. 450-451, p. 356-365, 2013.
- VILELLA, I. V. *et al.* Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: SILVA *et al.* **Genética Toxicológica**. 1º Ed. Porto Alegre: Alcance, 2003. P. 145-163.
- WEI, Y. *et al.* Anti-cancer effects of dioscin on three kinds of human lung cancer celllines through inducing DNA damage and activating mitochondrial signalpathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 118-128, 2013.
- ZOU, J. *et al.* Olaquinox-induced genotoxicity and oxidative DNA damage in human hepatoma G2 (HepG2) cells. **Mutation Research**, v. 676, p. 27-33, 2009.
- ZULO, M. A. T.; MORAES, R. M.; Efeito de diferentes condições de fermentação sobre o teor e composição da fração de saponinas do suco de sisal. **Bragantia, Campinas**, v. 43, p. 479-486, 1984.