

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**A VANILINA COMO UM AGENTE MODULADOR DA
GENOTOXICIDADE. RISCO OU BENEFÍCIO?**

Marialva Sinigaglia

**Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito
parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências**

Orientadora: Dra. Heloísa Helena Rodrigues de Andrade

Porto Alegre

03/2004

À uma pessoa especial, Heloísa
aos meus dois amores, Paulo e Júlia, e
aos meus Pais, Pedro e Jacira

Quando eu digo para você cuidar
Das pessoas que estão a nossa volta
Não digo apenas porque é delicado ou bonito
Mas pelo sucesso e crescimento do amor
Que a gente sente um pelo outro

Cuidar de um Jardim requer carinho
E atenção não só do jardineiro,
Mas também da flor!

Outro dia, em um momento de poesia
Pedi às flores do teu jardim
Que cuidassem bem daquelas que amamos,
Porque a felicidade de quem a gente gosta
É uma flor no jardim de Deus
E mais do que nunca a humanidade
Precisa ser regada todo dia

Pedro Marodin

AGRADECIMENTOS

Cada pessoa é uma mina escondendo preciosidades muito além de sua própria percepção
Pedro Marodin

À Heloisa

Helô, minha grande Mestra

Gostaria de trazer-te versos lindos

Porém, trago-te apenas algumas simples palavras de agradecimentos
que brotam do meu coração

Agradeço a sua excelente orientação e seus ensinamentos que foram
muitos os quais tentarei seguir ao longo da minha vida profissional

A sua mão que encontrei estendida quando precisei de apoio

As tuas palavras que me orientaram e me fizeram levantar

Sua força e beleza interior

A lição de vida que você passa

Realmente, seu coração é enorme e é capaz de abrigar todo mundo

E se cheguei até aqui podes ter certeza, foi pelo seu apoio

Obrigado, você mora no meu coração

À Biba,

Pela sua amizade, apoio, e conselhos. Agradeço também toda a ajuda
prestada durante o doutorado, que foi muita. Adorei ter convivido
contigo durante estes quatro anos e posso dizer que me ensinastes
muito. Você também habita em meu coração. Obrigada

Quando alguém ama, ganha asas para ver um mundo diferente, e têm não apenas os olhos, mas a alma flutuando ao lado da flor da pessoa amada.

Pedro Marodin

Ao Paulo

Quanta coisa já passamos juntos,
Quantos momentos pude contar com seu colo e,
Sentir o calor do teu abraço,
Quantos sonhos realizamos,
Obrigado por todos estes momentos, pela sua paciência,
companheirismo e compreensão.
Te amo.

À Júlia

Você é o sol que ilumina meus caminhos. A minha vida não seria a mesma sem o seu sorriso e seu carinho. Agradeço a Deus por ter você como filha. Te amo muito, muito mesmo.

Aos meus pais,

Duas pessoas maravilhosas, batalhadoras e com um grande coração. Muito obrigado, por terem me ensinado a manter meu coração aberto e agir sempre com honestidade.
Obrigado pela vida, pelo apoio e pelo amor. Vocês não tem idéia de "COMO É GRANDE O MEU AMOR POR VOCÊS".

Aos meus irmãos,

Mesmo distante, sei que posso contar sempre com vocês.
A essência que nos une é muito maior do que uma simples ligação fraterna – chama-se Amor. É isso que confere todo esse carinho, amizade e doação. Obrigado por tudo, adoro tê-los como irmãos.

À Vivi

Eu conheci a Vivi no doutorado e nossa amizade foi instantânea e posso dizer que ela esteve presente em todos os momentos pelos quais passei nestes quatro anos, tristes ou alegres, sempre pude contar com seus conselhos e sua ajuda. Quem sabe essa nossa amizade já estava escrita nas estrelas.

Ao Rafael, pela sua amizade, seus conselhos e seu jeito engraçado de encarar as coisas.

Ao Maurício, pela grande ajuda prestada durante o doutorado, seus conselhos e amizade.

À equipe do Laboratório de Mutagênese, Viviane Souza do Amaral, Rafael Dihl, Mariana Hoff, Leandro, Ana, Guilherme, Fábio e Magda pelo privilégio de poder contar sempre com vocês e principalmente pela amizade.

Às pessoas que de uma forma ou outra me ajudaram na realização deste trabalho: Alexandre, Camila, Graziela, Mariana, Janaina, Leandro, Paula e Ronaldo.

À Paula Baumgardt meu agradecimento especial pela grande ajuda prestada que foi de fundamental importância para a realização deste trabalho.

À Leo, minha querida madrinha e tia, obrigado por todo esse seu carinho e dedicação.

À Clessi, pelo seu carinho, amizade e tudo que fizestes por mim. Você é muito especial para mim.

Aos meus amigos, Alexandre Reimer, Aline Franco, Antonio Vigna, Carlos Alberto Colla (Caio), Cristiane Ostermann, Déborah Minuzzi, Evelin, Fernanda K. Moreira, Heloisa Ratier, Janaina Godinho, Kênya Ferro, Kênya da Silva Cunha, Knulp Vilar, Leandro C. Bombassano, Leila Gobbi, Lenice Pontes, Mariana Hoff, Maurício Lehmann, Natércia Lazzaroto, Paula Baumgardt, Pedro Marodin, Rafael Dihl, Ronaldo Campagna, Tatiana Sotili, Vanderlei F. G. Junior, Viviane Souza do Amaral, pela amizade, apoio e pelos momentos de descontração.

Aos amigos do Laboratório Toxigen da ULBRA pela amizade e ajuda sempre presente.

À Vivi e ao Rafael, pelas risadas e pelos momentos descontraídos e divertidos no bar do Antônio.

Ao Elmo, pela paciência, disponibilidade e amizade ao longo do curso de pós-graduação.

Aos colegas do Laboratório de Drosophila e de Imunogenética, pela amizade.

Ao Mário Juruena e Gustavo Ottoni, dois grandes profissionais que me ajudaram muito neste último ano

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Mutagênese do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e pela Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| Resumo..... | 10 |
| Abstract..... | 13 |
| Capítulo I: Introdução Geral | 16 |
| 1.1. Quimiopreventivos | 18 |
| 1.2. O alvo de estudo: vanilina (VA)..... | 19 |
| 1.2.1. Sistemas bacterianos..... | 21 |
| 1.2.2. Células de mamíferos em cultura..... | 25 |
| 1.2.3. <i>Drosophila</i> | 27 |
| 1.2.4. Mamíferos..... | 30 |
| 1.3. Objetivos..... | 33 |
| | |
| Capítulo II: Final VA-modulator effect expressed as enhancements in EMS- and BLEO-crossing over in proliferative somatic cells of <i>Drosophila melanogaster</i> | 35 |
| | |
| Capítulo III: Vanillin as a modulator agent in smart test: inhibition in the steps that precede MNU-, ENU- AND BLEO- genotoxicity..... | 59 |
| | |
| Capítulo IV: Discussão Geral | 76 |
| | |
| Capítulo V: Bibliografia Geral | 86 |

RESUMO

Há cerca de 20 anos a vanilina vem sendo descrita como uma substância moduladora capaz de inibir eventos relacionados à indução e promoção do processo carcinogênico. Este comportamento associado ao seu consumo elevado despertou o nosso interesse científico - resultando na publicação do primeiro trabalho associando a VA a acréscimos expressivos em eventos recombinacionais mitóticos, acompanhados de decréscimos na frequência de mutações pontuais e cromossômicas. Entretanto, quando a antimutagênese e a co-recombinogênese foram avaliadas simultaneamente, a ação final da VA refletiu-se não como proteção, mas sim como um efeito potencializador expresso como um aumento de cerca de 200 vezes na genotoxicidade total da MMC.

Na procura de respostas adicionais concernentes à ação da VA como moduladora de diferentes espectros de lesões no DNA utilizamos o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática em *Drosophila melanogaster* (SMART) com o intuito de avaliar o comportamento deste flavorizante em relação à genotoxicidade dos agentes químicos: N-methyl-N-nitrosourea (MNU), N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), ethylmethanesulphonate (EMS) e bleomicina (BLEO), em dois protocolos de administração do modulador - pós e co-tratamento.

Pós-tratamento

Os dados obtidos através do sistema de pós-tratamento evidenciaram que a VA não altera a mutagenicidade e a recombinogenicidade do ENU e MNU - o que sugere a não interferência deste flavorizante sobre os mecanismos envolvidos na correção das lesões induzidas por estes alquilantes. Ao contrário, a toxicidade genética do EMS foi significativamente aumentada em valores

compreendidos entre 7,79 a 29,79%, representando a expressão final de dois efeitos antagônicos: (i) sinergismo em recombinação mitótica e (ii) proteção em relação à mutagênese. Tais achados sugerem que diferenças entre o espectro dos danos induzidos por estes agentes alquilantes, podem afetar os caminhos de reparação a serem priorizados. Como consequência, o efeito potencializador da VA sobre recombinação homóloga (HR) está restrito ao EMS – o único dos agentes alquilantes monofuncionais estudados cujas lesões são processadas, em *Drosophila melanogaster*, por ambos mecanismos de reparo: excisão de nucleotídeos e pós-replicativo.

A VA também causou drásticos incrementos na genotoxicidade da BLEO - 120 a 178% - que estão limitados a aumentos em recombinação, uma vez que não foram observadas alterações na sua potência mutacional. Como a genotoxicidade da BLEO resulta basicamente da indução de quebras duplas corrigidas por mecanismos de reparação dependentes de recombinação - que podem ocorrer tanto entre cromossomos homólogos (HR) como não-homólogos (*end joining* -NHEJ) – e como o teste SMART privilegia a detecção de recombinação homóloga, os nossos dados indicam que a ação potencializadora de VA em relação a BLEO deve-se especificamente a incrementos em reparo dependente de HR. Ainda relevante é o fato de que estes acréscimos não estão associados a decréscimos em mutação, como anteriormente observado para a MMC. Todos estes dados indicam que a modulação da VA está restrita ao seu efeito sinérgico sobre recombinação somática – promovendo especificamente a recombinação homóloga em células proliferativas de *Drosophila*.

Co-tratamento

Através deste procedimento ficou claro que a VA diminui significativamente a toxicidade genética total dos alquilantes MNU e ENU e do agente intercalante bleomicina. Os decréscimos observados

tanto para o MNU quanto para o ENU são basicamente atribuídos ao seu papel promotor sobre o processo de detoxificação - que leva a diminuição no número de metilações e etilações induzidas respectivamente pelo MNU e pelo ENU. Adicionalmente, a caracterização da VA como um potente captador de radicais livres, especialmente em função do seu efeito sobre os danos oxidativos induzidos pela BLEO - explica a sua ação desmutagênica em relação a este agente intercalante.

Todos estes dados referentes ao efeito modulador da VA não permitem a quantificação da relação risco-benefício do seu consumo, especialmente pela dificuldade prática de se medir o quanto a sua presença concomitante com as genotoxinas - representado por efeito benéfico, via interferência no potencial genotóxico - ou a sua ação após a indução dos danos genéticos, através da promoção de reparo recombinacional e conseqüente aumento em HR, contribuem para a expressão final do seu efeito modulador. Entretanto, o papel fundamental da recombinação homóloga na gênese de inúmeras doenças genéticas, incluindo o câncer, e a preponderante ação recombinogênica da VA são um sinal de alerta.

ABSTRACT

For twenty years Vanillin (VA) has been described as a modulator agent able to inhibit events related with the induction and promotion of carcinogenesis. This behavior and the widespread use of VA have raised our interest which led to the publication of the first scientific study linking VA to expressive increases in mitotic recombinational events followed by decreases in the frequencies of point and chromosomal mutations. Yet, when antimutagenic and co-recombinagenic actions were assessed simultaneously, VA was shown not to have protective action, but rather a potentiator effect expressed as a 200-fold increase in the total mitomycin C (MMC) genotoxicity.

In the search for additional answers to explain the VA-modulator effect in different DNA lesion spectra, the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster* was used to assess the genotoxicity of the following chemical compounds: N-methyl-N-nitrosourea (MNU), N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), ethylmethanesulphonate (EMS), and bleomycin sulfate (BLEO), in two modulator agent treatment series: post-treatment and co-treatment.

Post-treatment

The data obtained by the post-treatment series revealed that VA does not alter the mutagenic nor the recombinagenic action of ENU and MNU, which points to VA as not interfering in the mechanisms involved in the correction of lesions caused by those alkylating agents. On the contrary, the genetic toxicity of EMS was significantly increased in figures that ranged from 7.79% to 29.79%, representing the final expression of two antagonistic effects: (i) synergism in mitotic recombination, and (ii) protection against mutagenesis. Such findings suggest that differences in the spectra of damage caused by these

alkylating agents may affect the preferential repair pathways. As a result, the VA-potentiator action on homologous recombination (HR) is restricted to EMS — the only mono-alkylating agent studied whose lesions are processed in *Drosophila melanogaster* via both repair pathways: nucleotide excision repair and post-replication repair.

VA also caused drastic increases in BLEO genotoxicity (120 % to 178%), which are limited to recombination increases inasmuch as no changes in the compound's mutagenicity were observed. Since BLEO genotoxicity is basically due to the induction of double-strand breaks that are corrected by recombination-dependent repair mechanisms, which may occur between homologous (HR) and non-homologous (end joining - NHEJ) chromosomes, and since the SMART places emphasis in the detection of homologous recombination, our results point to the VA-potentiator action on BLEO as being due specifically to increases in HR-dependent repair. It's important to emphasize the fact that these increases are not associated with decreases in mutational events, as previously observed for MMC. All these data point to the VA-modulator effect as being restricted to the synergistic effect it has on somatic recombination, promoting specifically the homologous recombination in proliferative *Drosophila* cells.

Co-treatment

The VA co-treatment protocol effected a significant decrease in the total genotoxicity of the alkylating agents MNU and ENU, and the intercalating agent BLEO. The decreases observed either for MNU or ENU are essentially ascribed to the role these compounds play as promoters in the detoxification process, which leads to the reduction of the number of methyl and ethyl groups induced by MNU and ENU, respectively. Additionally, the characterization of VA as a potential scavenger of free radicals, specifically in terms of its effect on the BLEO-induced oxidative damage, explains the desmutagenic action

played by VA in the presence of this intercalating drug.

None of this data on the VA-modulator effect enables the quantification of the risk-benefit relationship for its consumption. This is especially due to the difficulty of measure how much of its concomitant presence with the genotoxins – represented by a beneficial effect via interference in the genotoxic potential - or by action after the induction of the genetic damage, via promotion of recombinational repair and subsequent increase in HR, contribute to the final expression of the modulator effect. However, the fundamental role of the homologous recombination in the genesis of countless genetic diseases including cancer and the preponderant VA recombinagenicity are an alert signal.

Capítulo I

Introdução Geral



Se as coisas são inatingíveis... Ora! Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora a mágica presença das estrelas!
Mário Quintana

Apesar de todo o avanço tanto no conhecimento do processo carcinogênico quanto no desenvolvimento de novas terapias para o seu combate, a mortalidade associada ao câncer é ainda muito alta, especialmente se considerarmos as projeções de que, em 2003, cerca de 550.000 americanos deverão vir a óbito como consequência desta enfermidade. Outro ponto relevante refere-se ao risco do seu desenvolvimento, já que se estima que cerca de 43% dos homens e 38% das mulheres norte-americanas deverão desenvolver algum tipo de câncer ao longo de 2003 (Jemal e cols., 2002).

Dentre os inúmeros fatores envolvidos na etiologia do câncer destacam-se a predisposição genética, a exposição a mutágenos e carcinógenos - que incluem agentes naturais, químicos, radiação e tipos específicos de vírus - assim como o estilo de vida e os hábitos alimentares. O papel crucial da alimentação sobre o surgimento desta doença é comprovado por dados epidemiológicos, mostrando que 80% dos casos de câncer de cólon estão associados a uma alimentação incorreta. Esta associação é computada também para os cânceres em geral, mostrando valores próximos a 35% - podendo chegar a 60%, quando somados ao consumo de cigarro e álcool. Ainda dentro deste panorama destaca-se a contribuição da predisposição genética, representada por 20%, assim como os carcinógenos ambientais apontados como os mais potentes agentes envolvidos na etiologia desta enfermidade (Reddy e cols., 2003).

De fato, o acúmulo de dados centrados no comportamento celular e molecular do processo carcinogênico evidenciou o papel crucial dos danos induzidos no material genético por agentes ambientais, que estão diretamente associados a alterações celulares tanto em nível genético quanto bioquímico. Entretanto, em cada uma das etapas da mutagênese, assim como da carcinogênese - que inclui iniciação, promoção e progressão tumoral (Reddy e cols., 2003) - existe uma possibilidade de intervenção, através do uso de agentes genericamente

definidos como quimiopreventivos: capazes de reverter ou impedir a fixação das lesões no DNA, assim como o desenvolvimento e progressão das células pré-cancerosas em direção a malignidade (Gerhäuser e cols., 2003).

1.1. QUIMIOPREVENTIVOS

Os quimiopreventivos, aqueles agentes que modulam a mutagenicidade e/ou a carcinogênese, pertencem a dois grandes grupos: os que interferem sobre a mutagênese – designados como antimutagênicos – e os que atuam nas diferentes etapas do processo carcinogênico – chamados de anticarcinogênicos (Dashwood, 2002)

Baseado nos conceitos iniciais da antimutagênese, Kada e cols., (1982) classificaram os antimutagênicos em duas principais categorias, que foram correlacionadas ao seu modo de ação: desmutagênicos e bioantimutagênicos. Os primeiros desempenham sua ação protetora por interferir sobre as genotoxinas antes que elas atuem sobre o DNA, podendo agir como: (i) inibidores dos mutagênicos, (ii) inibidores da captação de mutagênicos, (iii) bloqueadores da ativação metabólica de promutagênicos, (iv) indutores da detoxificação dos agentes xenobióticos ou (v) bloqueadores da interação entre o DNA e a genotoxina. Por sua vez os bioantimutagênicos atuam após a indução dos danos genéticos, promovendo os processos de reparo, impedindo a fixação das lesões e, conseqüentemente, diminuindo a freqüência de mutações (Hartman e Shankel, 1990).

Ainda que exista um grau de correlação entre a antimutagênese e a anticarcinogênese (Wattenberg, 1985, 1990; De Flora e Ramel, 1988; De Flora, 1998), os moduladores do processo carcinogênico são incluídos em categorias distintas. Assim, aqueles que interferem sobre a iniciação do câncer, através de um ou mais mecanismos, são chamados

de agentes bloqueadores, enquanto que os que modulam o processo da progressão são denominados de supressores (Fig. 1).

Um número expressivo de trabalhos experimentais, desenvolvidos ao longo dos últimos dez anos, identificou cerca de 600 compostos, incluídos em classes químicas distintas, que se caracterizam por possuir uma propriedade até então pouco explorada: a capacidade de reduzir danos genéticos induzidos por genotoxinas e carcinógenos específicos (Kassie e cols., 2003). Talvez a maior relevância destas investigações tenha sido a demonstração de que muitas destas substâncias fazem parte da dieta alimentar humana e que, portanto, podem contribuir para a diminuição do risco genético imposto pela crescente exposição a agentes genotóxicos. Dentre estas se destacam os aromatizantes, não apenas em função da sua presença em diferentes tipos de alimentos e elevado consumo, mas principalmente pela sua capacidade de melhorar a qualidade dos sistemas enzimáticos envolvidos na correção de diferentes tipos de danos genéticos. Na verdade, as informações acerca da interferência de tais substâncias sobre o processo mutagênico estão baseadas, fundamentalmente, nos seus efeitos sobre mutações pontuais e aberrações cromossômicas, havendo ainda uma lacuna no que se refere ao monitoramento dos eventos relacionados com recombinação mitótica.

1.2. O ALVO DE ESTUDO: VANILINA (VA)

A vanilina (3-metóxi-4-hidroxibenzaldeído), também conhecida como aldeído vanílico, ocorre naturalmente nas sementes de baunilha (*Vanilla planifolia*, *V. tahitensis* e *V. pompona*) e em frutas silvestres. Pode ainda ser encontrada em chás, café e bebidas alcoólicas (Feron e cols., 1991), bem como na porção semivolátil da fumaça do cigarro (Ohta, 1993). Devido ao seu aroma e sabor agradáveis, é amplamente utilizada como flavorizante em doces, sorvetes e embutidos em geral

(Kuroda e Inouye, 1988). Considerando a sua vasta distribuição em diferentes tipos de alimentos comuns à dieta humana, estima-se que o seu consumo médio diário seja da ordem de 11 a 38,9 mg/pessoa.

A vanilina é caracterizada como uma substância destituída de risco genético, uma vez que se mostrou incapaz de causar alterações genômicas, que incluem mutações gênicas e cromossômicas, tanto em sistemas-teste *in vitro* (Kasamaki e cols., 1982; Ishidate e cols., 1986; Sasaki e cols., 1987a,b; Imanishi e cols., 1990; Tamai e cols., 1992) quanto em bio-ensaios *in vivo* (Andrade e cols., 1992; Santos e cols., 1999). Além disso, estudos realizados em ratos demonstraram ausência de citotoxicidade ou reações adversa para um consumo de 50.000 ppm de vanilina, durante um ano ou 10.000 ppm por dois anos (Hagan e cols., 1967).

Ao longo dos últimos 20 anos, a vanilina vem sendo caracterizada como um agente antimutagênico. Tal classificação baseia-se na demonstração de que este aromatizante é capaz de modular os efeitos mutagênicos e clastogênicos de diversos agentes genotóxicos. De fato, independentemente do sistema teste utilizado, bem como do organismo empregado, observa-se um comportamento constante: decréscimos nas freqüências de parâmetros genéticos relacionados, basicamente, com o tipo de lesão induzida pela genotoxina que está sendo estudada (Ohta, 1993).

1.2.1. Sistemas Bacterianos

As primeiras evidências quanto ao mecanismo envolvido na ação antimutagênica da vanilina foram obtidas por Ohta e cols. (1986), através de abordagens experimentais *in vitro*, utilizando células procarióticas. Investigando a propriedade de 25 aromatizantes, os autores observaram que a vanilina foi capaz de reduzir as freqüências de revertentes Trp⁺, quando células de *Escherichia coli* WP2 foram pré-

incubadas com 4-nitroquinoleína-1-óxido (4NQO), furilfuramida (AF2), captan e metilglioxal. Quando este efeito modulador foi avaliado em linhagens mutantes bloqueadas em reparo por excisão ressíntese – dependentes de *uvrA* - ou em reparo indutor de erro, do tipo *lexA/recA* – verificou-se um pronunciado aumento de viabilidade em ambos os tipos de células. No entanto, em cepas defectivas no mecanismo de reparo recombinacional, este acréscimo de viabilidade não foi observado. A partir destas observações os autores sugeriram que a vanilina estimula um processo de reparação pós-replicativo livre de erro, dependente de recombinação.

Adicionalmente, este mesmo grupo de pesquisa avaliou a interferência da VA sobre a viabilidade de linhagens de bactérias proficientes, ou não, nos múltiplos mecanismos de reparo inerentes a estas células. Utilizando como metodologia de exposição o sistema de pós-tratamento – onde as células bacterianas foram irradiadas com UV e posteriormente cultivadas em meio contendo 600 µg/ml de vanilina – foi possível visualizar um aumento estatisticamente significativo nas taxas de sobrevivência de cepas *uvrA*⁻ e *umuC*, embora tenham sido observados acréscimos moderados, neste mesmo parâmetro, nos mutantes *recB* e *recC*. Ainda mais, no momento em que a mutação *recA* foi introduzida neste último genoma, observou-se o total desaparecimento do efeito modulador – confirmando que a ação antimutagênica promovida pela VA depende basicamente da melhoria da qualidade do reparo recombinacional (Ohta e cols., 1988).

Na tentativa de elucidar estes resultados, foram adotadas metodologias que permitiram examinar a influência da VA sobre a frequência de recombinação entre dois plasmídeos – pATH4 (Cmr Tcs) e pBMX7 (Apr Tcs) em cepas *uvrA*⁻ *umuC*. A partir deste bioensaio foi possível demonstrar que a VA causou um incremento altamente significativo na ocorrência de permuta – o que sugere a sua ação sobre eventos recombinacionais. Assim, se por um lado este aromatizante

comprovadamente diminui a freqüência de mutação, por outro pode estar exercendo este efeito modulador às expensas de acréscimos em recombinação (Ohta e cols., 1988).

Com o intuito de obter maiores informações sobre o potencial modulador da vanilina, Takahashi e cols. (1990) quantificaram a resposta SOS através da expressão do gene para β -galactosidase, em linhagens de *E. coli* portadoras do plasmídeo pSK1002, contendo a fusão dos genes *umuDC'-lacZ'*. As células previamente tratadas com UV expressaram níveis aumentados de β -galactosidase, especialmente quando pós-tratadas com altas concentrações de vanilina (5mM). Sato e cols. (1991) obtiveram um efeito semelhante ao monitorar os níveis desta mesma enzima em cepas PQ37, contendo a fusão *sulA::lacZ*. Porém foi observado um leve incremento na indução da resposta SOS, quando a VA foi administrada simultaneamente com as genotoxinas 4NQO ou metilnitrosuréia (MNU). O conjunto destes resultados, somado aos previamente obtidos, levou a indicação de que a VA possa estar envolvida na indução de reparo dependente do produto do gene *recA*.

Procurando estabelecer uma relação entre estrutura química e potencial modulador, foi investigado o potencial antimutagênico do benzaldeído e de 25 derivados, entre eles a vanilina. Foi monitorada a resposta bioantimutagênica destes compostos sobre a mutagênese induzida por 4NQO, em *Escherichia coli* WP2_s *uvrA trpE*. Esta análise demonstrou que dos 26 aldeídos avaliados, 18 foram capazes de diminuir a freqüência de eventos mutagênicos, sendo destacados como potentes supressores os agentes: vanilina, vanilal, protocaldeído, 2,5-dimetoxibenzaldeído, *o*-anisaldeído e *m*-anisaldeído. Considerando que o álcool benzílico e os análogos do ácido benzóico não apresentaram nenhum efeito antimutagênico, pôde-se inferir que tal propriedade depende da presença do radical aldeído. Ainda foi possível evidenciar que, em geral, derivados etóxi são menos efetivos do que os metóxi, salientando ainda que este último radical, quando nas posições orto ou

meta do benzaldeído, potencializa a atividade bioantimutagênica (Watanabe e cols., 1988).

Procurando elucidar os efeitos antimutagênicos da vanilina em nível molecular, Shaughnessy e cols. (2001) determinaram o espectro de mutações espontâneas da cepa TA24 (*hisG428*, *rfa*, *uvrB*, pKM101) de *Salmonella typhimurium*, antes e após o tratamento com VA - demonstrando que este flavorizante reduziu a frequência de mutação espontânea em valores na ordem de 50%. A pergunta que surgiu a partir desta análise foi se este efeito antimutagênico era devido à redução em todas as classes de mutações ou se estava restrito a uma classe específica. A determinação do espectro de mutações espontâneas, em presença ou ausência de VA, evidenciou decréscimos em todas as classes de mutações avaliadas - com exceção das transições AT→GC - quando as células foram tratadas com VA. Entretanto, a única categoria a apresentar diferença estatisticamente significativa, em relação ao controle, foi a das transversões GC→TA. A base para esta inibição seletiva, restrita aos sítios GC, é ainda desconhecida. Entretanto, o fato de não ter sido observada redução significativa nos sítios AT, pode estar diretamente relacionado à baixa frequência desta classe de mutações - em relação ao espectro de mutações espontâneas observadas para GC. Utilizando cepas *hisG428* que apresentam diferenças quanto à proficiência em dois mecanismos de reparo - excisão de nucleotídeos e reparo SOS - os autores procuraram estabelecer a participação destes dois mecanismos sobre os decréscimos nas frequências de mutações espontâneas induzidos pela VA. Nenhum efeito antimutagênico foi observado na cepa bloqueada tanto no reparo por excisão de nucleotídeos quanto no SOS. A mesma resposta foi obtida quando se avaliou a linhagem deficiente em reparo indutor de erro. De fato, o efeito protetor da VA foi somente evidenciado na cepa proficiente para o mecanismo SOS - sugerindo que os efeitos antimutagênicos da VA estão vinculados a funcionalidade

deste processo de reparação. A somatória dos conhecimentos obtidos até o presente momento, leva a sugestão de que a VA aumenta o efeito de um reparo recombinacional dependente de SOS.

1.2.2. Células de Mamíferos em Cultura

Dando continuidade a avaliação do potencial modulador da VA, e considerando a sua provável utilização como um agente protetor para a saúde humana, vários estudos foram desenvolvidos em cultura de células de mamíferos. Utilizando a linhagem V79 de hamster Chinês (CHO), demonstrou-se que o pós-tratamento com VA diminui a frequência de mutações induzidas tanto por UV como por radiação X, no loco 6-tioguanina (6-TG) - sugerindo que tais diminuições refletem a sua real atividade bioantimutagênica, visto que não foram observados aumentos na taxa de mortalidade e na inibição do crescimento celular (Imanishi e cols., 1990).

O pós-tratamento com VA, reduziu significativamente a ação aneugênica e clastogênica das radiações X e ultravioleta (UV), assim como do quimioterápico metotrexato em cultura de células V79 (Keshava e cols., 1997, 1998). Tais achados são observados não apenas para as aberrações cromossômicas, mas também para a citotoxicidade associada ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Considerando que os danos induzidos pelo H_2O_2 incluem quebras de cadeia simples e duplas de DNA - levando a fixação de aberrações cromossômicas - foi sugerido que esta ação protetora está relacionada à melhoria do processo de reparação destas quebras, mediada pela VA. Por outro lado, o co-tratamento com este flavorizante levou a acréscimos dose-dependentes no que se refere a citotoxicidade e a mutações no loco 6-TG, induzidas pelo etilmetanosulfonato (EMS). Já no pós-tratamento estes aumentos se restringiram ao parâmetro mutação (Tamai e cols., 1992).

Um outro enfoque, se refere à interferência da VA sobre trocas entre cromátides irmãs (TCIs) induzidas por diferentes mutágenos, em cultura de células CHO. Utilizando o protocolo de pós-tratamento, verificou-se que a VA potencializou as TCIs - induzidas pela pré-exposição das células aos seguintes agentes: EMS, mitomicina C (MMC), *N*-etil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (ENNG), *N*-etil-*N*-nitrosuréia (ENU) e MNU. Por outro lado, nenhum efeito foi evidenciado em relação as TCIs provocadas pelo metilmetanosulfonato (MMS) e *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) (Sasaki cols., 1987a,b). Adicionalmente, foram observados aumentos nas freqüências de TCIs, que foram acompanhados por decréscimos na formação de aberrações cromossômicas do tipo quebras em fase G2 do ciclo celular, quando as células foram pré-tratadas com MMC e radiação UV (Sasaki e cols., 1987a, 1990a). Decréscimos relacionados a dois parâmetros: intertrocas e quebras cromossômicas também foram observadas em células CHO pré-expostas a RX, na fase G1 do ciclo celular, enquanto que em G2 somente este último parâmetro foi suprimido pela VA. Considerando que estes efeitos, dependentes das fases G1 e G2, não foram observados na presença de 2',3'-dideoximidina - um potente inibidor de polimerase β - sugeriu-se que o potencial anticlastogênico da VA relaciona-se ao favorecimento de um sistema de reparo pós-replicativo mediado por esta enzima (Sasaki e cols., 1990a).

Recentemente, foi monitorada a habilidade da VA em inibir mutações no locus *CD59* do cromossomo humano 11, induzidas por: H_2O_2 , MNNG, MMC e radiação- γ ^{137}Cs em células A_L (células híbridas, humano-camundongo). De fato, tanto o pré quanto o co-tratamento inibiram as mutações causadas por estes três agentes químicos, ao mesmo tempo em que aumentaram as suas toxicidades. Entretanto, este comportamento não foi alterado quando as culturas foram expostas a radiação- γ ^{137}Cs . Na tentativa de caracterizar os mecanismos envolvidos no comportamento observado, os autores sugeriram que a

VA possa estar agindo como um potencializador do reparo de bases mal-pareadas - levando a diminuição nas freqüências de mutações, as expensas de acréscimos na taxa de mortalidade - já que este processo induz lesões letais, por introduzir quebras adjacentes às bases alquiladas. De fato, células deficientes neste mecanismo de reparação tornam-se resistentes a ação citotóxica do MNNG, ao mesmo tempo em que são hipermutáveis. Entretanto, esta hipótese não pode ser utilizada para explicar os dados obtidos para H₂O₂ e MMC. Neste caso, é sugerido que a ação da VA estaria relacionada à inibição do reparo pós-replicativo, levando a um aumento na mortalidade das células mutadas - o que explicaria tanto os acréscimos de toxicidade como os decréscimos de mutação (Gustafson e cols., 2000).

Além da avaliação do potencial antimutagênico e anticlastogênico da VA, um outro ponto abordado atualmente, refere-se à sua interferência sobre o metabolismo da 4-(dimetilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) - um potente indutor de câncer de pulmão. Para esta análise, microsossomos oriundos do fígado e do pulmão (0,1mg de proteína do fígado e 0,25mg de proteína do pulmão) de camundongos com 7 a 10 semanas de idade foram tratados com concentrações variáveis de VA (0 a 500 μ M). Utilizando esta metodologia demonstrou-se que este flavorizante inibiu significativamente os diferentes metabólitos do NNK - em função da sua interação com enzimas de metabolização do tipo citocromo P450 e carbonil-redutase (Morse e cols., 1995).

1.2.3. Drosophila

Em virtude do grande número de trabalhos realizados *in vitro* e da carência de análises *in vivo*, nosso grupo de pesquisa procurou avaliar as propriedades da VA em sistemas mais complexos. Utilizando como organismo experimental a *Drosophila melanogaster*, em um primeiro

momento, investigou-se o efeito deste flavorizante sobre a perda espontânea do cromossomo X em anel. Neste protocolo, fêmeas $ywsn^3$ expostas ou não a diferentes concentrações de VA foram cruzadas com machos não tratados, pertencentes à linhagem $C1(2)yB /y^+YB^S$ – demonstrando que a VA induziu decréscimos dose-dependentes na perda espontânea do cromossomo X em anel, alcançando valores máximos de 59%. Posteriormente, quando o comportamento deste flavorizante foi avaliado em relação aos danos induzidos pela MMC e pelo MMS, o que se verificou foram decréscimos, também dependentes da dose de VA empregada, restritos às lesões induzidas pela MMC (Andrade e cols., 1992). É um fato bem estabelecido, que os espermatozoides de *Drosophila* não possuem enzimas de reparo, desta forma as lesões pré-mutagênicas presentes nestas células permanecem não reparadas. A correção dos danos, ocorre após a fertilização, por sistemas enzimáticos presentes nos oócitos das fêmeas (Aaron e Leigh, 1981; Smith e cols., 1983; Vogel e cols., 1985). Como as biadições induzidas pela MMC são reparadas pela ação cooperativa dos sistemas de reparo por excisão e pós-replicativo – que levam, respectivamente, a quebras de cadeia dupla de DNA (DSBs), e posterior correção destas quebras – pode-se sugerir que a perda de cromossomo X em anel está diretamente relacionada à permanência das DSBs (Leigh, 1976; Vogel e Natarajan, 1979; Zijlstra e Vogel 1988). Assim, o efeito anticlastogênico observado pode ser atribuído a melhoria da qualidade do reparo pós-replicativo promovido pela VA (Andrade e cols., 1992). Por outro lado, não foi evidenciada interferência deste flavorizante em relação aos danos induzidos pelo MMS. Estes resultados, estão de acordo com os previamente obtidos *in vitro*, reforçando a sugestão de que a modulação da VA depende do dano induzido no DNA e, conseqüentemente, do mecanismo de reparo envolvido na sua correção (Andrade e cols., 1992; Tamai e cols., 1992).

Adicionalmente, em 1999, nosso grupo de pesquisa publicou

primeiro trabalho demonstrando que o pós-tratamento com VA efetivamente diminui as freqüências de mutações e portanto, é um agente antimutagênico, ao mesmo tempo em que aumenta a permuta mitótica. Em função das peculiaridades do bio-ensaio empregado - Teste para Detecção de Mutação e Recombinação (SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster* - foi possível demonstrar, no que se refere às lesões induzidas pelo agente alquilante bifuncional MMC, que a ação recombinogênica da VA causou um incremento na indução de permuta entre cromossomos homólogos da ordem de 190%. Concomitantemente, este aromatizante diminuiu em 79% a freqüência de mutações pontuais e cromossômicas. Outro ponto relevante refere-se a magnitude destes dois comportamentos antagônicos, ou seja promoção de recombinação e diminuição de eventos mutacionais. Quando a antimutagênese e a co-recombinogênese foram avaliadas simultaneamente, a ação final da VA refletiu-se não como proteção, mas sim como um efeito potencializador expresso como um aumento de quase 200 vezes na genotoxicidade total da MMC. Conseqüentemente, pode-se inferir que tais incrementos devem-se basicamente a ação sinérgica da VA sobre eventos relacionados com permuta genética (Santos e cols., 1999). Ainda que o MMS e a mostarda nitrogenada bifuncional (HN2), tenham sido avaliados neste mesmo sistema, não foram observadas respostas moduladoras da VA. Em uma segunda etapa, foram realizados experimentos, envolvendo a exposição simultânea das células alvo as genotoxinas e a vanilina. Assim, utilizando o protocolo de co-tratamento, pode-se evidenciar o efeito antimutagênico da VA tanto para o MMS quanto para MMC, porém o mesmo não foi verificado em relação ao HN2. Foram sugeridos alguns mecanismos através dos quais a VA pode estar exercendo a sua ação desmutagênica, que podem ser relacionados à atividade antioxidante, supressão da atividade metabólica ou ainda interação com grupos ativos destes dois agentes alquilantes (Santos e cols., 1999).

1.2.4. Mamíferos

Apesar do número expressivo de estudos desenvolvidos em cultura de células de mamíferos, poucos são os trabalhos centrados no seu comportamento *in vivo*. Dentro deste contexto, camundongos da linhagem BDF1 receberam uma dose única intraperitoneal de MMC, sendo posteriormente tratados com VA - via sonda gástrica, em intervalos de 3 horas. O ponto máximo de inibição na frequência de micronúcleos, em eritrócitos polinucleados (MNPCE), foi atingido quando a VA foi administrada em intervalos de 6 a 9 horas após a exposição a MMC. Este efeito diminuiu gradualmente entre os períodos de 12 a 18 horas, desaparecendo completamente após 21 horas - sugerindo que na presença de VA as quebras cromossômicas induzidas pela MMC foram mais eficientemente reparadas, via reparo recombinacional (Inouye e cols., 1988). Tais achados corroboram os resultados obtidos *in vitro*, assim como os obtidos em *D. melanogaster* (Andrade e cols., 1992; Santos e cols., 1999). Entretanto, quando a VA e a MMC foram avaliados através de protocolo de co-tratamento, não houve alteração na frequência de micronúcleos, indicando que este benzaldeído não exerce atividade desmutagênica em relação a esta genotoxina (Inouye e cols., 1988). Utilizando metodologia semelhante e camundongos oriundos da linhagem ddY, Sasaki e cols. (1990b) comprovaram o efeito antimutagênico da VA em relação às lesões induzidas pela radiação X. A redução máxima na frequência de MNPCE (60%) ocorreu quando a VA foi administrada imediatamente após o tratamento com radiação X, decrescendo progressivamente, até desaparecer - quando o intervalo de tempo entre a administração do agente físico e o tratamento com VA excedeu 12 horas.

O efeito protetor da vanilina foi também demonstrado quando se utilizou o teste para detecção de manchas mutantes em células somáticas de camundongos - que se baseia no cruzamento de

camundongos machos da linhagem PW com fêmeas C57BL/10, visando a obtenção de uma prole heterozigota para 5 loci relacionados à expressão de cor de pelagem. No 10º dia de gestação as fêmeas receberam injeções de ENU (12,5 – 50mg/kg) e 3 administrações orais sucessivas de vanilina (125 – 500mg/kg administradas 0, 4 e 24 horas após a exposição ao agente genotóxico). Aproximadamente 30 dias após o nascimento a prole foi avaliada quanto ao aparecimento de manchas mutantes – o que permitiu evidenciar que as três administrações sucessivas de vanilina (nas doses de 250 até 500mg/kg) diminuíram a frequência das manchas em aproximadamente 50% (Imanishi e cols., 1990).

Na procura de informações relativas a interferência da VA sobre a gênese de tumores malignos, ratos F344 receberam injeções intraperitoniais de dietilnitrosamina (DEN, 100mg/kg) e MNU (20mg/kg) ou subcutâneas de 1,2-dimetilhidrazina (DMH, 40mg/kg), durante um período de 4 semanas. Os animais ganharam, nas duas primeiras semanas, dieta líquida contendo 0,05% de N-butil-N-(4-hidróxibutil)nitrosamina (BBN) substituída, nas duas semanas subsequentes, por solução aquosa a 0,1% de 2,2'-dihidróxi-di-n-propilnitrosamina (DHPN) - tratamento DMBDD. Estes animais foram divididos em dois grupos: o primeiro recebeu suplemento de vanilina a 1 % um dia antes do final da indução com o tratamento DMBDD até o final da quarta semana – grupo 1 - e o segundo foi tratado com VA 1% uma semana após o final do tratamento DMBDD até o final do experimento – grupo 2. Paralelamente, dois outros grupos de animais receberam somente as genotoxinas ou o modulador. Todos os animais que sobreviveram foram sacrificados no final da 36ª semana para posterior análise histológica dos órgãos. Apesar da vanilina ter induzido uma fraca inibição na incidência de câncer de intestino delgado - em ambos os grupos - e na ocorrência de adenoma de pulmão, somente

para o grupo 1, o efeito maior observado foi uma potencialização da carcinogênese órgão-específica. Este incremento significativo foi evidenciado nos tumores de intestino grosso (73%), no número de túbulos renais atípicos e na frequência de papilomas de estômago. O conjunto destes resultados permitiu concluir que a vanilina atua como um agente potencializador tanto na iniciação como na promoção da carcinogênese, evidenciando o risco da sua utilização como um agente quimiopreventivo (Akagi e cols., 1995).

1.3. OBJETIVOS

A ação da vanilina como promotora de eventos recombinacionais mitóticos, especialmente no que se refere às lesões induzidas pela MMC, reforça o delineamento de novas estratégias experimentais para a caracterização do risco/benefício do seu uso como moduladora de alterações genômicas. A prévia confirmação de que este flavorizante diminui a frequência de mutações, gênicas e/ou cromossômicas induzidas pela MMC, ao mesmo tempo em que propicia incrementos em permuta mitótica evidencia o efeito co-recombinogênico da VA - que é significativamente maior do que a sua ação bioantimutagênica (Santos e cols., 1999). Considerando a estreita relação entre recombinação e perda de heterozigose, o papel da permuta sobre o desenvolvimento do câncer (Fearon e Vogelstein, 1990; Bishop e Schiestl, 2003), assim como seu alto consumo, este trabalho empregou o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*, procurando atingir os seguintes objetivos:

Avaliar a ação bioantigenotóxica da VA sobre genotoxinas que induzem distintos tipos de lesões, considerando como parâmetros genéticos mutações gênicas e cromossômicas, assim como recombinação mitótica - através do sistema de pós-tratamento, representado pelo tratamento prévio com diferentes genotoxinas EMS, MNU, ENU e bleomicina (BLEO) - seguido da exposição à VA;

Caracterizar a atividade antigenotóxica da VA sobre EMS, MNU, ENU e BLEO, considerando o seu efeito modulador sobre mutações e permuta somática, utilizando o protocolo de co-tratamento caracterizado pela exposição simultânea à VA e às genotoxinas;

Quantificar a magnitude da ação moduladora da VA sobre mutações e recombinação, tanto no que se refere a sua atividade antígenotóxica quanto bioantígenotóxica - através da comparação dos resultados obtidos nos imagos heterozigotos para o cromossomo balanceador *TM3* e nas moscas trans-heterozigotas para os genes marcadores *flr³* e *mwh*.

Capítulo II

Final VA-modulator effect expressed as
enhancements in EMS- and BLEO-crossing
over in proliferative somatic cells of
Drosophila melanogaster



Environmental and Molecular Mutagenesis,
enviado para publicação

**Final VA-modulator effect expressed as enhancements in EMS-
and BLEO-crossing over in proliferative somatic cells of
*Drosophila melanogaster***

Running title: **VA enhances EMS and BLEO crossing over**

**Marialva Sinigaglia¹, Maria Luíza Reguly¹ and Heloísa Helena
Rodrigues de Andrade^{1,2 *}**

¹Laboratório de Mutagênese, Departamento de Genética, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Laboratório de Diagnóstico da Toxicidade Genética – TOXIGEN,
Universidade Luterana do Brasil - ULBRA, Canoas, RS, Brasil.

*Correspondence to and present address: Heloísa H. R. de Andrade,
Laboratório de Diagnóstico da Toxicidade Genética – TOXIGEN,
Universidade Luterana do Brasil - ULBRA, Prédio 22, 4º andar, Rua
Miguel Tostes, 101, 92420-280, Canoas, RS, Brasil. Tel: + 55 51
4779214; Fax: + 55 51 4782893. E-mail: heloisa@ulbra.br

Abstract

Vanillin (VA) is a flavoring agent that in previous studies has both increased and decreased the genotoxicity of chemical agents, depending on the nature of both the agent and the genetic event measured. The ability of VA to modulate the mutagenicity and recombinogenicity of three different mono-alkylating agents, N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), N-methyl-N-nitrosourea (MNU) and ethyl methanesulfonate (EMS), and the intercalating agent bleomycin (BLEO) was examined using the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. While neither the mutagenicity nor the recombinogenicity of ENU or MNU was modified by post-treatment with VA, EMS-induced genetic toxicity was significantly enhanced by as much as 29.79%. This overall enhancement included a synergistic increase in mitotic recombination and a lesser decrease in mutation. VA also caused marked increases in BLEO-induced genotoxicity (from 120 to 178%). This enhancement was restricted to an increase in recombinational events, since no alteration in BLEO-induced mutation was observed. The data suggest that the major VA-modulatory action on genotoxicity in *D. melanogaster* is related to its synergistic effects on somatic recombination, which has a greater consequence on overall genotoxicity than its antimutagenic effects. Since the SMART assay is specifically sensitive to mitotic crossing-over, our data suggest that VA promotes toxicant-induced homologous recombination, at least in the proliferative cells of *Drosophila*.

Key words: Vanillin; SMART test; co-recombinogenicity.

Introduction

The possibility of modulating the cellular responses to genotoxins by dietary factors has opened a new frontier for cancer control, making the factors causing genomic instability a target for cancer intervention [Hayatsu et al., 1998]. Preventing cancer by decreasing the rate of mutation accumulation may be an effective strategy for either the modulation or inhibition of the pathological process [Liviero and von Borstel, 1996]. However, modulatory agents appear to work through multiple mechanisms and may produce protective, additive, or synergistic effects.

Vanillin (VA; 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) is a flavoring agent found in a variety of food products; it is consumed at a per capita rate of 11 to 38.9 mg/day. Initial observations indicated that VA had antimutagenic effects against several genotoxins, such as 4-nitroquinoline (4-NQO) and furylfuramide (AF-2). Further studies using the Salmonella reversion assay, and the chromosomal aberration and micronucleus assays found that VA protected cells against the genotoxicity of a variety of chemical and physical agents [Ohta et al., 1983; Ohta et al., 1988; Andrade et al., 1992; Gustafson et al., 2000]. However, assays using sister chromatid exchange (SCE) and homologous mitotic recombination as genetic endpoints indicate that VA can potentiate genotoxicity [Sasaki et al., 1987; Santos et al., 1999].

Progress in understanding the modulatory action of VA on genotoxicity has been made using the *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation and Recombination Test (SMART), since this assay measures and partially distinguishes between mutational events and homologous recombination in proliferative somatic cells. Previous studies by our group found that VA post-treatment dramatically increased the frequency of mitotic recombination caused by mitomycin C (MMC) in the SMART, although point mutations and clastogenic events were

significantly reduced. The data suggested that VA not only blocked the pathway leading from MMC-induced lesions to mutations, but also channeled a large proportion of these lesions into recombinational repair. It also appeared that the co-recombinagenic activity of VA was related to the type of induced lesion and consequently to the repair processes involved in its correction, because an increase in mitotic recombination was not observed for the simple alkylating agent methyl methanesulfonate (MMS) or the bifunctional nitrogen mustard (HN2) [Santos et al., 1999].

In the present study, we used the SMART assay to further examine the synergistic effect of VA on chemically-induced homologous recombination, and to address the question of whether the reduction in mutations caused by VA is accompanied by a increase in recombinational repair. We examine the modulatory action of VA in relation to the somatic mutation and mitotic recombination induced by ethyl methanesulfonate (EMS), bleomycin (BLEO), N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) and N-methyl-N-nitrosourea (MNU). In previous studies, VA was found to *(i)* decrease the frequency of BLEO-induced chromosome aberrations in cultured mammalian cells; *(ii)* decrease ENU-induced somatic mutation in mice and increase the incidence of SCE in cultured Chinese hamster cells; *(iii)* increase the SCE and forward mutations induced by EMS in cultured Chinese hamster cells; and *(iv)* have no effect on MNU-induced mutagenesis in *E. coli* and increase MNU-induced SCE in cultured mammalian cells [Ohta, 1993].

Material and Methods

Chemical Compounds

Vanillin (VA; CAS Registry No. 121-33-5) was purchased from Vetec Química Fina (São Paulo, Brazil). It was dissolved in 5% ethanol (Merck, Darmstadt, Germany) and administered at two concentrations (0.5 and 1.0%).

Ethyl methanesulfonate (EMS; 62-50-0), N-ethyl-N-nitrosourea (ENU; 759-73-9), and N-methyl-N-nitrosourea (MNU; 684-93-5) were purchased from Sigma (Saint Louis, MO). Bleomycin sulfate (BLEO; 9041-93-4) was obtained from Biossintética (São Paulo, Brazil). These agents were dissolved in distilled water immediately before use.

Drosophila Strains Used and Collection of Larvae for Treatment

The SMART assay detects two general classes of genetic events using two different strains of *Drosophila melanogaster*, which carry specific genetic markers (*mwh* and *flr³*) on the left arm of chromosome 3. Virgin females were collected from *flr³/In(3LR)TM3, ri p^d sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* fly stocks and crossed with *mwh/mwh* males. More detailed information on the genetic symbols can be found in Lindsley and Zimm [1992]. These flies were allowed to lay eggs during 8 h in culture bottles containing a solid agar base (3% w/v) completely covered with a layer of live fermenting yeast supplemented with sucrose. Approximately 72 h after the end of the egg-laying stage, the larvae were washed out of these bottles with tap water through a fine-meshed stainless steel strainer, and used for the treatments.

Larval exposures

The larvae were put into Plexiglas tubes with a fine nylon gauze covering the lower end. The tubes were placed into 50-ml beakers

containing 0.3 g of powdered cellulose (Merck) mixed with 2 ml of distilled water or mutagen solution (46.1 mM EMS; 3 mM ENU, 3 mM MNU or 0.05 mM BLEO). The larvae fed on these cellulose suspensions through the gauze for 2 h. The control and treated groups were then washed and put into vials with 1.5 g of instant medium (Carolina Biological Supply, Burlington, NC) containing either 5% ethanol or 5% ethanol containing either 0.5 or 1% VA. The larvae were allowed to feed on this medium until pupation, approximately 48 h. All the experiments were carried out at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and 60-70% relative humidity.

Wing Spot Test

Approximately 10-12 days after the treatments, the emerging adult flies were collected and stored in 70% ethanol. The *mwh* x *flr*³ standard cross produced two types of progeny that were distinguished phenotypically based on Bd^s marker: (i) trans-heterozygous flies for the recessive wing-cell markers multiple wing hair (*mwh*) and flare (*flr*³), and (ii) heterozygous flies for a balancer chromosome with large inversions on chromosome 3 (*TM3*). Wings of five females and five males of the two phenotypes were mounted on slides and scored under a microscope at 400X magnification for the occurrence of spots. Induced loss of heterozygosity in the marker-heterozygous genotype leads to two types of mutant clones: (i) single spots, either *mwh* or *flr*³, which result from point mutation, chromosome aberration and/or mitotic recombination, and (ii) twin spots, consisting of both *mwh* and *flr*³ sub-clones, which originate exclusively from mitotic recombination [Graf et al., 1984]. In flies with the balancer-heterozygous genotype, *mwh* spots reflect predominantly somatic point mutation and chromosome aberration, since mitotic recombination involving the balancer chromosome and its structurally normal homologue is a lethal event [Szabad et al., 1983; Vogel et al., 1999]. By comparing these two

genotypes it was possible to quantify the modulatory effect of VA on the recombinagenic and mutagenic activities of the genotoxins.

Statistical analysis

The data were evaluated according to the multiple-decision procedure of Frei and Würzler [1988], which makes four different diagnoses: positive, weakly positive, negative or inconclusive. The frequencies of each type of mutant clones per fly of a treated series were compared pair-wise (i.e., control vs. VA; genotoxin alone vs. genotoxin plus VA) using the conditional binomial test of Kastembaum and Bowman [1970]. Based on the control-corrected frequencies of clone formation per 10^5 cells, the percentages of VA interference were calculated for significant effects as follows: $[(\text{genotoxin alone} - \text{genotoxin plus VA}) / \text{genotoxin alone}] \times 100$ [Abraham, 1994].

Results and Discussion

Marker-heterozygous (*mwh/flr³*) and balancer-heterozygous (*mwh/TM3*) *Drosophila* were used to assess the genotoxicity of VA alone (Table I) and the effect of post-treatment with VA on the genotoxicity of MNU, ENU, EMS and BLEO (Table II). Significance testing was performed on the number of spots in treated groups and the corresponding concurrent controls.

Negative and Positive Controls

VA alone (0.5 and 1.0%) did not modify the frequencies of single and twin spots in comparison to the negative control, which means that VA was not genotoxic and had no modulatory effect on lesions responsible for spontaneous responses in the SMART assay (Table I). This observation confirms our previous findings [Santos et al., 1999], as well as other literature reports [Imanishi et al., 1990; Tamai et al., 1992]. However, in other studies VA reduced spontaneous mutagenesis at G:C sites in *Salmonella typhimurium* strain TA104 [Shaughnessy et al., 2001], and spontaneous ring X loss in *Drosophila* [Andrade et al., 1992]. The SMART assay preferentially detects heterozygous loss induced by homologous recombination, which probably involves pathways that differ from those involved in bacterial reversion and ring X loss.

MNU, ENU, EMS and BLEO were genotoxic and produced mitotic recombination in marker-heterozygous (*mwh/flr³*) flies. Likewise, significant mutational responses were observed; each of the compounds increased the frequency of total spots in balancer-heterozygous (*mwh/TM3*) flies. The frequencies of mutant spots induced by the four genotoxins in the later genotype were smaller than those obtained in trans-heterozygous flies (Table II). All these findings are consistent with previously reported responses for these compounds in the SMART assay

[Negishi et al., 1991; Stephanou et al., 1991; Cedenberg and Ramel, 1989; Magnusson and Ramel, 1990; Clements and Vogel, 1988]. In addition, the genotoxicity of BLEO was restricted to the induction of small single spots, as previously described by Graf et al. [1984].

Effects of post-treatment with VA

Drosophila larvae were treated with MNU, ENU, EMS, and BLEO for 2 h, and then grown on medium containing VA. The distribution of mutant clones among the different classes of spots that can be recovered in the wing-SMART assay is shown in Table II, including the data observed after the analysis of trans-heterozygous and TM3-heterozygous flies. Neither MNU- nor ENU-induced mutagenicity and/or recombinagenicity was modified by the post-treatment with VA (Table II), which suggests that VA has no effect on the mechanisms involved in the processing of MNU- and ENU-induced lesions. Our MNU data are in agreement with observations indicating that VA has no effect on MNU-induced mutation in *E. coli* [Takahashi et al., 1990]. However, VA post-treatment reduced the mutagenicity of ENU in mice, as measured by frequency of recessive carrier pups [Imanishi et al., 1990], and increased the frequency of ENU-induced SCE [Sasaki et al., 1987].

VA significantly increased the frequency of spots induced by both EMS and BLEO in *mwh/flr³* flies. For EMS, 0.5% VA increased only the large single, twin and total spot frequencies, while 1% VA produced small, but significant increases in all spot classes. The frequency of mutant clone formation in EMS-treated *mwh/flr³* flies was increased 7.79% by 0.5% VA and 29.79% by 1% VA. Post-treatment with VA increased the frequencies of only small single and total spots in BLEO-treated *mwh/flr³* flies, however the increases were relatively large, 120% for 0.5% VA and ~178% for 1% VA (Table II).

The effect of VA treatment on the genotoxicity of EMS and BLEO was quite different in *mwh/TM3* flies. Using this mutation-specific assay,

VA caused an inhibition of EMS-induced activity, reducing the induced spot frequency by almost 30%, while having no effect on the responses produced by BLEO (Table II). Mutant clones due to recombination are unlikely to be recovered in the balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*), which means the spots detected in this genotype are all of mutational origin.

Figure 1 graphically depicts the modulation of EMS and BLEO genotoxicity by VA in terms of its separate effects on mutation and recombination. 46.1 mM EMS induced a total of 9.66 spots per fly through a combination of mutation and recombination; 0.5 and 1% VA increased this frequency to 10.69 and 12.40, respectively. The overall increase in the trans-heterozygous flies is the result of two competing effects of VA: (i) an anti-mutagenic effect, i.e., EMS alone induced 3.89 clones per fly due exclusively to mutation, while 0.5 and 1 % VA reduced this frequency to approximately 3.0; and (ii) a co-recombinagenic effect, i.e., 5.77 of the total clones produced by EMS alone were formed by mitotic recombination, but in presence of 0.5 and 1% VA the frequency of clones due to recombinational events increased to 7.70 and 9.46 mutant clones per fly, respectively. Because the antimutagenic properties of VA were less than its co-recombinagenic activity, VA post-treatment produced a significant increase in the genotoxicity of EMS in trans-heterozygous flies.

BLEO treatment alone resulted in a frequency of 3.02 total mutant clones/fly; 1.27 and 1.75 spots per fly were due to mutational and recombinational events, respectively (Fig. 1). Post-treatment with 0.5% and 1% VA increased the frequency of total spots/fly to 5.36 and 6.52, respectively. Since the *mwh/TM3* data indicated that VA had no effect on the mutagenicity of BLEO, VA increased the frequency of BLEO-induced clones due to recombination by a factor of ~3 (to 5.10 clones per fly for post-treatment with 1% VA). Altogether, these results indicate that VA has at best a small inhibitory effect on the

mutagenicity of EMS and of no interference in the mutational potency of BLEO, the major effects is a relatively strong synergistic effect on mitotic recombinational events.

BLEO is a DNA-intercalating agent that is capable of inducing oxidative damage. Exposure to BLEO preferentially results in DNA double-strand breaks (DSBs) [Porvik and Austin, 1991], which have two main pathways competing for their repair: homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ) [Daboussi et al., 2002]. The prominent effect of VA on recombinational repair pathways is apparent from its synergistic effect on the genotoxicity of BLEO in post-treatment protocols (Fig. 1). While this data suggests that VA promotes HR, it also suggests the involvement of mitotic crossing over in the process, because the majority of all mutant clones of recombinational origin in the SMART assay are the result of this specific event.

It is difficult to explain why VA modulates the genotoxicity of EMS but not ENU, since both agents share the same types of N-alkylation damage, as well as O^6 -ethyldeoxyguanosine, although in different proportions [Beranek, 1990]. Using two repair-deficient *D. melanogaster* strains, *mus201* (*ner⁻*; deficient in nucleotide excision repair (NER), and *mus308* (*btm⁻*; deficient in a damage bypass mechanism), it was concluded that *Drosophila* do not use the identical repair mechanisms for the correction of the lesions induced by EMS and ENU. In the *ner⁻* background, EMS-induced strand breaks were increased in relation to *ner⁺*, but ENU-induced strand breaks were similar in both strains. Also, both EMS and ENU produced a dose-responsive induction in strand breaks in *btm⁻* flies, however, the dose-response for EMS was non-linear while it was linear for ENU [Bilbao et al., 2002]. These observations indicate that in spite of the similarity in the type of lesions induced by both agents, their differential damage-spectra could affect the pathways by which the lesions are repaired. The differential effects of VA on the recombinagenicity and antimutagenicity

of EMS and ENU that were seen in our study are consistent with this conclusion.

In a previous study [Santos et al., 1999], we found that VA had no effect on the genotoxicity of MMS-induced lesions, as was true for MNU-induced genotoxicity in the present study. MMS and MNU methylate DNA primarily at the N-7 position of guanine, and both agents (i) produced more strand breaks in *ner*⁻ than *ner*⁺ flies, and (ii) produced the same number of strand breaks in *btm*⁻ and *btm*⁺ flies [Bilbao et al., 2002]. Taken together, these findings indicate that the synergistic action of VA on the recombinogenic properties of the mono-alkylating agents that have been analyzed is restricted to EMS, the only drug whose lesions are processed in *Drosophila melanogaster* by both NER and the post-replication repair process missing in *btm*⁻ flies.

Conclusions

In a previous report we suggested that VA not only is able to block the pathway leading to mutation induction by MMC, but also can channel MMC-induced lesions into recombinational repair [Santos et al., 1999]. The observations for MMC are consistent with the effect of VA on the genotoxicity of EMS in this present study. However, the results from this present study also indicate that these dual effects on mutation and recombination are not a general property of the modulatory activity of VA, since our data indicate that VA acts exclusively as a promoter of BLEO recombination, without any interference in the mutations induced by BLEO. The primary factor underlying the VA-modulatory action is related to its synergistic effect on somatic recombination in *D. melanogaster*, an activity that appears to be independent of the significant decreases this flavoring agent produces in the mutagenicity of certain genotoxins. Homologous mitotic recombination can result in loss of heterozygosity or genetic rearrangements, and these events are involved in the genesis of numerous diseases, including cancer [Bishop

and Schiestl, 2003]. The evidence indicating that the major effect of VA on the genotoxicity of chemical agents is an increased frequency of HR suggests that there may be a risk associated with the consumption of this flavoring agent.

Acknowledgements

This study was supported by the following Brazilian Agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Pró-Reitoria de Pesquisa – UFRGS (PROPESQ-UFRGS) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul(FAPERGS).

References

- Abraham SK. 1994. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. *Mutagenesis* 9:383-386.
- Andrade HHR, Santos JH, Gimmler-Luz MC, Correa MJF, Lehmann M, Reguly ML. 1992. Suppressing effect of vanillin on chromosome aberrations that occur spontaneously or are induced by mitomycin C in the germ cell line of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 279:281-287.
- Beranek DT. 1990. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* 231:11-30.
- Bilbao C, Ferreiro JA, Comendador MA, Sierra M. 2002. Influence of *mus201* and *mus308* mutations of *Drosophila melanogaster* on the genotoxicity of model chemicals in somatic cells in vivo measured with the comet assay. *Mutat Res* 503:11-19.
- Bishop AJR, Schiestl RH. 2003. Role of homologous recombination in carcinogenesis. *Exp Mol Pathol* 74:94-105.
- Cedenberg H, Ramel C. 1989. Modifications of the effect of bleomycin in the somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 214:69-80.
- Clements J, Vogel EW. 1988. Somatic recombination and mutation assays in *Drosophila*: A comparison of the response of two different strains to four mutagens. *Mutat Res* 209:1-5.
- Daboussi F, Dumay A, Delacôte F, Lopez BS. 2002. DNA double-strand break repair signalling: The case of RAD51 post-translational regulation. *Cell Signal* 14:969-975
- Frei H, Würigler FE. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat Res* 203:297-308.

- Frei H, Clements J, Howe D, Würigler FE. 1992. The genotoxicity of the anticancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 279:21-33.
- Graf U, Würigler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB, Kale PG. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen* 6:153-188.
- Gustafson DL, Franz HR, Ueno AM, Smith J, Doolittle DJ, Waldren CA. 2000. Vanillin (3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde) inhibits mutation induced by hydrogen peroxide, *N*-methyl-*N*-nitrosoguanidine and mitomycin C but not ¹³⁷Cs Y-radiation at the *CD59* locus in human-hamster hybrid A_L cells. *Mutagenesis* 15:207-2113.
- Hayatsu H, Arimoto-Kobayashi S, Negishi T. 1998. Use of activated heterocyclic amines in the screening of dietary antimutagens. *Mutat Res* 402:225-230.
- Imanishi H, Sasaki YF, Matsumoto K, Watanabe M, Ohta T, Shirasu, Y and Tutikawa K. 1990. Suppression of 6-TG-resistant mutations in V79 cells and recessive spot formation in mice by vanillin. *Mutat Res* 243:151-158.
- Kastembaum MA, Bowman KO. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res* 9:527-549.
- Lindsley DL, Zimm GG. 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. San Diego: Academic Press, CA. 1133pp.
- Liviero L, von Borstel RC. 1996. The 4th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis: A summary. *Mutat Res* 350:287-293.
- Magnusson J, Ramel C. 1990. Inhibitor of poly (ADP-ribose)transferase potentiates the recombinogenic but not the mutagenic action of alkylating agents in somatic cells *in vivo* in *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis* 5:511-514.
- Negishi T, Shiotani T, Fujikawa K, Hayatsu H. 1991. The genotoxicities of *N*-nitrosamines in *Drosophila melanogaster* *in vivo*: the correlation of

- mutagenicity in the wing spot test with the DNA damages detected by the DNA-repair test. *Mutat Res* 252:119-128.
- Ohta T. 1993. Modification of genotoxicity by naturally occurring flavorings and their derivatives. *Crit Rev Toxicol* 23:127-146.
- Ohta T, Watanabe M, Morya M, Shirasu Y, Kada T. 1983. Antimutagenic effects of cinnamaldehyde on chemical mutagenesis in *E. coli*. *Mutat Res* 107:219-227.
- Ohta T, Watanabe M, Shirasu Y, Inouye T. 1988. Post-replication and recombination in *uvrA umuC* strains of *Escherichia coli* are enhanced by vanillin, an antimutagenic compound. *Mutat Res* 201:107-112.
- Porvirk LF, Austin MJF. 1991. Genotoxicity of bleomycin. *Mutat Res* 257:127-143.
- Santos JH, Graf U, Reguly ML, Andrade HHR. 1999. The synergistic effects of vanillin on recombination predominate over its antimutagenic action in relation to MMC-induced lesions in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 444:355-365.
- Sasaki YF, Imanishi H, Ohta T, Shirasu Y. 1987. Effects of antimutagenic flavourings on SCEs induced by chemical mutagens in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res* 189:313-318.
- Shaughnessy DT, Setzer RW, DeMarine DM. 2001. The antimutagenic effect of vanillin and cinnamaldehyde on spontaneous mutation in *Salmonella* TA104 is due to a reduction in mutations at GC but not AT sites. *Mutat Res* 480-481:55-69.
- Stephanou G, Demopoulos NA, Catsoulacos P. 1991. Genotoxic effect of the antitumour agent homo-aza-steroidal ester of *p*-bis-(2-chlorethyl)aminophenoxy acetic acid (NSC 294859) tested in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Mutagenesis*. 6:325:328.
- Szabad J, Soós I, Polgár G, Héjja G. 1983. Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal tests. *Mutat Res* 113:117-133.

- Takahashi K, Sekiguchi M, Kawazoe Y. 1990. Effects of vanillin and *o*-vanillin on induction of DNA-repair networks: modulation of mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mutat Res* 230:127-134.
- Tamai K, Tezuka H, Kuroda Y. 1992. Different modifications by vanillin in cytotoxicity and genetics changes induced by EMS and H₂O₂ in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res* 268:231-237.
- Vogel W, Graf U, Frei HJ, Nivard MMJ. 1999. The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. In: McGregor DB, Rice JM, Venitti S, editors. The use of short- and medium-term tests for carcinogens data on genetic effects in carcinogenic hazard evaluation. Lyon, IARC Sci. Publi 146 p 427-470.

Table I. Summary of results obtained in the wing spot test of *D. melanogaster*: acute exposure with H₂O (2 h) followed by post-treatment with vanillin (VA; 44±2 h). 3-day-old standard cross larvae: marker-trans-heterozygous (*mwh* / *flr*³) and balancer-heterozygous (*mwh* / *TM3*) flies.

| Fly Genotypes | VA ^b (%) | No. of flies (N) | Spots per fly (no. of spots)/statistical diagnosis ^a | | | | Total <i>mwh</i> clones ^d (n) | Mean <i>mwh</i> clone size class ^{d,e} | Clone induction frequencies (per 10 ⁵ cells per cell division) ^f (n/NC) ^{e,g} |
|--------------------------------------|---------------------|------------------|---|--|--------------|-------------|--|---|--|
| | | | Small single spots ^c (1-2 cells) | Large single spots ^c (>2 cells) | Twin spots | Total spots | | | |
| <i>mwh</i> / <i>flr</i> ³ | 0 | 100 | 0.70 (70) | 0.09 (9) | 0.06 (6) | 0.85 (85) | 83 | 1.82 | 1.70 |
| | 0.5 | 100 | 0.53 (53) – | 0.06 (6) – | 0.09 (9) – | 0.68 (68) – | 68 | 2.03 | 1.39 [-0.31] |
| | 1.0 | 100 | 0.60 (60) – | 0.10 (10) – | 0.09 (9) – | 0.79 (79) – | 78 | 1.92 | 1.60 [-0.10] |
| <i>mwh</i> / <i>TM3</i> | 0 | 100 | 0.57 (57) | 0.01(1) | ^h | 0.58 (58) | 58 | 1.38 | 1.19 |
| | 0.5 | 100 | 0.39 (39) + | 0.03 (3) – | | 0.42 (42) – | 42 | 1.43 | 0.86 [-0.33] |
| | 1.0 | 100 | 0.48 (48) – | 0.02 (2) – | | 0.50 (50) – | 50 | 1.36 | 1.02 [-0.17] |

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würzler [1988] :+, positive; -, negative (P <0.05); ^bvanillin (48 h); ^cincluding rare *flr*³ single spots; ^dconsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots; ^enumbers in square brackets are induction frequencies corrected for spontaneous incidence estimated from negative controls; ^fcalculated according to Frei et al. [1992] ; ^gC=48.800, i.e., approximate number of cells examined per fly; ^honly *mwh* single spots can be observed in *mwh/TM3* heterozygotes as the balancer chromosome *TM3* does not carry the *flr*³ mutation.

Table II. Summary of results obtained in the wing spot test of *D. melanogaster*: acute exposure with MNU, ENU, EMS and BLEO (2 h) followed by post-treatment with vanillin (VA; 44±2 h). 3-day-old standard cross larvae: marker-trans-heterozygous (*mwh / flr³*) and balancer-heterozygous (*mwh / TM3*) flies.

| Controls and compounds Genotypes | No. of flies | | Spots per fly (no. of spots)/statistical diagnosis ^a | | | | Total <i>mwh</i> clones ^e (n) | Mean <i>mwh</i> clone size class ^{e,f} | Clone induction frequencies (per 10 ⁵ cells per cell division) ^g (n/NC) ^{f,h} | Enhance- ment ⁱ (%) | Inhibi- tion ⁱ (%) |
|---|--------------------------|------------------------|---|--|---------------|----------------|---|---|--|--------------------------------------|-------------------------------------|
| | MUT ^b (mM) | VA ^c (%) | Small single spots ^d (1-2 cells) | Large single spots ^d (>2 cells) | Twin spots | Total spots | | | | | |
| MNU | | | | | | | | | | | |
| <i>mwh / flr³</i> | 0 | 0 | 40 | 0.75 (30) | 0.15 (6) | 0.08 (3) | 0.98 (39) | 37 | 1.84 | 1.90 | |
| | 3 | 0 | 40 | 1.93 (77) | 2.48 (99) | 0.90 (36) | 5.30 (212) | 173 | 2.97 [3.28] | 8.86 [6.97] | |
| | 3 | 0.5 | 40 | 2.25 (90) - | 2.20 (88) - | 0.48 (19) w+ | 4.93 (197) - | 154 | 2.70 [2.97] | 7.89 [5.99] | |
| | 3 | 1.0 | 40 | 2.08 (83) - | 2.00 (80) - | 0.70 (28) - | 4.78 (191) - | 159 | 2.72 [2.98] | 8.15 [6.25] | |
| <i>mwh / TM3</i> | 0 | 0 | 40 | 0.45 (18) | 0.00 (0) | j | 0.45 (18) | 18 | 1.44 | 0.92 | |
| | 3 | 0 | 40 | 1.68 (67) | 1.13 (45) | | 2.80 (112) | 112 | 2.37 [2.54] | 5.74 [4.82] | |
| | 3 | 0.5 | 40 | 2.03 (81) - | 1.45 (58) - | | 3.48 (139) - | 139 | 2.47 [2.63] | 7.12 [6.20] | |
| | 3 | 1.0 | 40 | 1.48 (59) - | 1.18 (47) - | | 2.65 (106)- | 106 | 2.56 [2.78] | 5.43 [4.51] | |

| ENU | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|------|-----|----|---------------|---------------|---------------|----------------|-----|-------------|---------------|-------|
| <i>mwh / flr³</i> | 0 | 0 | 40 | 0.75 (30) | 0.08 (3) | 0.05 (2) | 0.88 (35) | 35 | 1.80 | 1.79 | |
| | 3 | 0 | 40 | 3.57 (143) | 3.95 (158) | 1.48 (59) | 9.00 (360) | 314 | 2.89 [3.03] | 16.09 [14.29] | |
| | 3 | 0.5 | 40 | 3.78 (151) - | 3.78 (151) - | 1.90 (76) - | 9.45 (378) - | 339 | 2.92 [3.05] | 17.37 [15.57] | |
| | 3 | 1.0 | 40 | 4.28 (171) - | 3.48 (139) - | 1.50 (60) - | 9.25 (370) - | 328 | 2.77 [2.88] | 16.80 [15.01] | |
| <i>mwh / TM3</i> | 0 | 0 | 40 | 0.68 (27) | 0.03 (1) | j | 0.70 (28) | 28 | 1.39 | 1.43 | |
| | 3 | 0 | 40 | 1.58 (63) | 1.10 (44) | | 2.68 (107) | 107 | 2.45 [2.82] | 5.48 [4.05] | |
| | 3 | 0.5 | 40 | 1.83 (73) - | 1.43 (57) - | | 3.25 (130) - | 130 | 2.46 [2.75] | 6.66 [5.23] | |
| | 3 | 1.0 | 40 | 1.68 (67) - | 1.40 (56) - | | 3.08 (123) - | 123 | 2.49 [2.81] | 6.30 [4.87] | |
| EMS | | | | | | | | | | | |
| <i>mwh / flr³</i> | 0 | 0 | 80 | 0.64 (51) | 0.15 (12) | 0.05 (4) | 0.84 (67) | 67 | 2.31 | 1.64 | |
| | 46.1 | 0 | 80 | 3.39 (271) | 4.34 (347) | 1.94 (155) | 9.66 (773) | 658 | 3.31 [3.42] | 16.85 [15.14] | |
| | 46.1 | 0.5 | 80 | 3.26 (261) - | 5.04 (403) w+ | 2.39 (191) w+ | 10.69 (855) w+ | 704 | 3.31 [3.42] | 18.03 [16.32] | 7.79 |
| | 46.1 | 1.0 | 80 | 3.91 (313) w+ | 5.53 (442) w+ | 2.96 (237) w+ | 12.40 (992) w+ | 834 | 3.29 [3.38] | 21.36 [19.65] | 29.79 |
| <i>mwh / TM3</i> | 0 | 0 | 90 | 0.42 (38) | 0.01 (1) | j | 0.43 (39) | 39 | 1.38 | 0.89 | |
| | 46.1 | 0 | 90 | 1.77 (159) | 1.54 (139) | | 3.31 (298) | 298 | 2.58 [2.76] | 6.79 [5.90] | |
| | 46.1 | 0.5 | 90 | 1.34 (121) w+ | 1.11 (100) w+ | | 2.46 (221) w+ | 221 | 2.62 [2.88] | 5.03 [4.14] | 29.83 |
| | 46.1 | 1.0 | 90 | 1.43 (129) w+ | 1.03 (93) w+ | | 2.47 (222) w+ | 222 | 2.55 [2.80] | 5.05 [4.17] | 29.32 |

| | | BLEO | | | | | | | | | |
|------------------------------|------|------|----|--------------|-------------|--------------|--------------|-----|-------------|---------------|--------|
| <i>mwh / flr³</i> | 0 | 0 | 50 | 0.82 (41) | 0.10 (5) | 0.04 (2) | 0.96 (48) | 48 | 1.96 | 1.97 | |
| | 0.05 | 0 | 50 | 2.64 (132) | 0.28 (14) | 0.10 (5) | 3.02 (151) | 148 | 1.69 [1.56] | 6.07 [4.10] | |
| | 0.05 | 0.5 | 50 | 5.10 (255) + | 0.20 (10) - | 0.06 (3) | 5.36 (268) + | 268 | 1.55 [1.46] | 10.98 [9.02] | 120.00 |
| | 0.05 | 1.0 | 50 | 6.10 (305) + | 0.38 (19) - | 0.04 (2) | 6.52 (326) + | 326 | 1.59 [1.52] | 13.36 [11.39] | 177.80 |
| <i>mwh / TM3</i> | 0 | 0 | 55 | 0.51 (28) | 0.02 (1) | ^j | 0.53 (29) | 29 | 1.34 | 1.08 | |
| | 0.05 | 0 | 55 | 1.18 (65) | 0.05 (3) | | 1.24 (68) | 68 | 1.41 [1.46] | 2.53 [1.45] | |
| | 0.05 | 0.5 | 55 | 1.00 (55)- | 0.07 (4)- | | 1.07 (59)- | 59 | 1.47 [1.60] | 2.20 [1.12] | |
| | 0.05 | 1.0 | 55 | 1.35 (74)- | 0.07 (4)- | | 1.42 (78)- | 78 | 1.45 [1.51] | 2.91 [1.83] | |

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würzler [1988] :+, positive; w+, weakly positive; -, negative (P <0.05); ^b mutagen (2 h); ^cvanillin (48 h); ^d including rare *flr³* single spots; ^econsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots; ^f numbers in square brackets are induction frequencies corrected for spontaneous incidence estimated from negative controls; ^g calculated according to Frei et al. [1992]; ^hC=48.800, i.e., approximate number of cells examined per fly; ⁱcalculated according to Abraham [1994] : (genotoxin alone – genotoxin plus VA/genotoxin alone)X 100; ^jonly *mwh* single spots can be observed in *mwh/TM3* heterozygotes as the balancer chromosome *TM3* does not carry the *flr³* mutation.

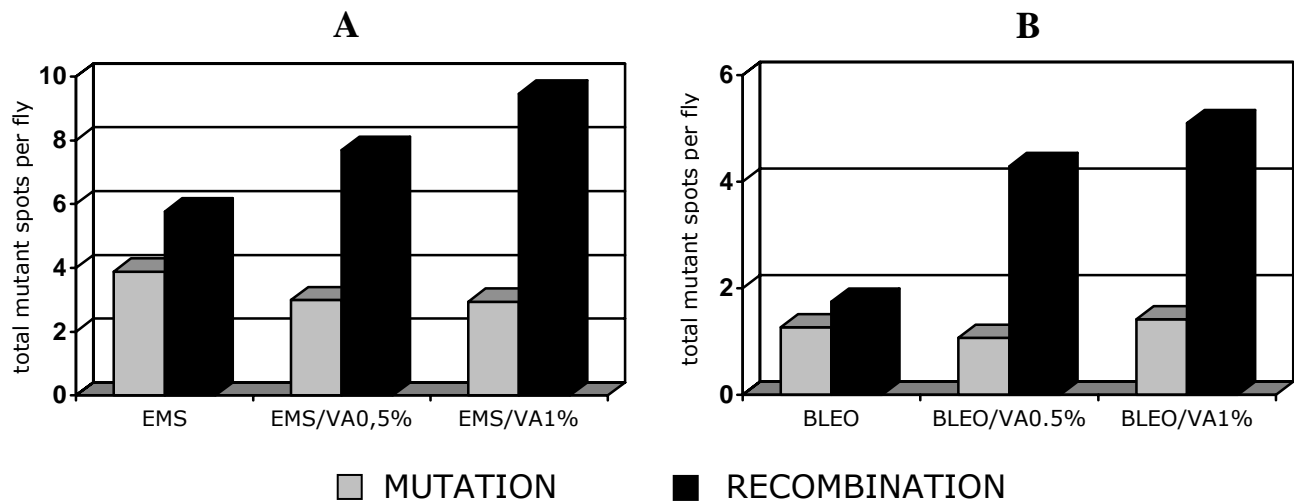


Fig.1. Contribution of mutation and recombination to the frequency of total mutant spots per fly in trans-heterozygous flies treated with EMS (A) and BLEO (B) followed by a post-treatment with VA. The recombinagenic action was calculated as follows:

Frequencies (F) = total spots mwh/N° of flies

Mutation Frequencies (F_M) = frequencies spots balancer-heterozygous/
frequencies spots marker-trans-heterozygous

Recombination Frequencies (F_R) = $1 - F_M$

Frequencies of total spots (F_T) = total spots in mwh/flr^3 flies (considering mwh and flr^3 spots)/ N° of flies

mutation = $F_T \times F_M$

recombination = $F_T \times F_R$

Capítulo III

**Vanillin as a modulator agent in SMART test:
inhibition in the steps that precede MNU-,
ENU- and BLEO-genotoxicity**



Mutation Research, enviado para publicação

Manuscript for *Mutation Research*

**VANILLIN AS A MODULATOR AGENT IN SMART TEST: INHIBITION
IN THE STEPS THAT PRECEDE MNU-, ENU- AND BLEO-
GENOTOXICITY**

**Marialva Sinigaglia¹, Maria Luíza Reguly¹ and Heloísa Helena
Rodrigues de Andrade^{1,2 *}**

¹Laboratório de Mutagênese, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.²Laboratório de Diagnóstico da Toxicidade Genética – TOXIGEN, Universidade Luterana do Brasil – ULBRA/ Canoas, Prédio 22, 4º andar, Rua Miguel Tostes, 101, 92420-280, Canoas, RS, Brasil.

Keywords: vanillin, SMART test, antigenotoxicity.

*Correspondence to and present address: Heloísa H. R. de Andrade, Laboratório de Diagnóstico da Toxicidade Genética – TOXIGEN, Universidade Luterana do Brasil - ULBRA, Prédio 22, 4º andar, Rua Miguel Tostes, 101, 92420-280, Canoas, RS, Brasil. Tel: + 55 51 4779214; Fax: + 55 51 4782893. E-mail: heloisa@ulbra.br

Abstract

Vanillin, the world's major flavoring compound used in food industry and confectionery products - that has antimutagenic and anticarcinogenic activity against a variety of diverse mutagenic/carcinogenic agents - was tested for interference in steps that preclude the production of DNA lesions. The overall findings using co-treatment protocols in SMART test suggest that VA can lead to a significant protection against the general genotoxicity of MNU, ENU and BLEO. Considering MNU and ENU the desmutagenic activity observed could result from VA-stimulation of detoxification, via induction of glutathione S-transferase. However, the protector effect related to BLEO could be attributed to its powerful scavenger ability, which has the potential to prevent oxidative damage induced by BLEO. No modulator effect was observed for the alkylating agent EMS.

Introduction

Despite many therapeutic advances in understanding the carcinogenic process, overall mortality statistics are unlikely to change until the concepts of natural products acting as new chemopreventive agents are accepted. Natural or semi-synthetic compounds known as the result of intensive research in the field of genome protection might be applied not only against mutagenesis but also against carcinogenesis [1]. Among these compounds, special attention has been paid to vanillin (3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde) - the world's major flavoring compound used in food industry and confectionery products [2] - that has antimutagenic and anticarcinogenic activity against a variety of diverse mutagens/carcinogens [3, 4, 5, 6, 7]. Its broad spectrum of action and its approval as an "additive" in foods make vanillin an interesting candidate for further studies as a modulator dietary compound.

VA was originally identified as a bioantimutagen effective not only in bacterial- but also in other experimental organism- mutagenesis [8, 9]. However, VA acts as potentiator factor considering genetic parameters like sister chromatid exchange (SCEs) and homologous mitotic recombination [10, 11, 12]. Using the wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) and the post-treatment protocol our group demonstrated that the final picture underlying the VA-modulator action is related to its synergistic effect on somatic recombination in *Drosophila melanogaster* - independently of the significant mutational decreases coupled to VA action. Considering SMART as an assay able to detect most specifically mitotic crossing over, our data pointed out that the final modulator effect of VA is an increased frequency of homologous recombination (HR) events [11, 12]. This observation, seen in the light of our normal day-to-day exposure to a wide variety of environmental and endogenous genotoxic agents,

which also increases the frequency of HR, pointed out the risks associated with their consumption. However, we must keep in mind that these data are exclusively related to VA interference in the mechanisms involved on the correction of specific damage type.

Another point to be stressed is related to the interference of VA in steps that preclude the production of DNA lesions, which can be evaluated using co-treatments protocols. In a previous report we suggested that vanillin might affect MMS and MMC mutation through inhibition or induction of metabolizing enzymes [11].

Using the SMART assay and the same genotoxins previously applied to study the interference of VA in the repair of specific lesion-type or specific broad-spectra damage [12] we tried to outline a more complete picture of the VA modulator effect focused on its interference in the steps that precede the DNA-induced lesions.

Material and Methods

Chemicals

Vanillin (VA, CAS Registry No. 121-33-5) was purchased from Vetec Química Fina (São Paulo, Brazil). It was dissolved in 5% ethanol (Merck; Darmstadt, Germany) and administered at two concentrations (0.5 and 1.0%).

The chemical compounds ethylmethanesulphonate (EMS, 62-50-0), N-ethyl-N-nitrosourea (ENU, 759-73-9), N-methyl-N-nitrosourea (MNU, 684-93-5) came from Sigma Chemical Company (Saint Louis, MO, USA). Bleomycin sulfate (BLEO - 9041-93-4) was obtained from Biossintética (São Paulo, Brazil). These agents were dissolved in 5% ethanol immediately before use.

Somatic Mutation and Recombination Test (SMART)

Following the methods described in Graf et al. [13], two different strains of *Drosophila melanogaster*, carrying gene markers on the left arm of chromosome 3, were used. Virgin females of the strain *flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd* were crossed with *mwh/mwh* males. Both genders were kept in culture vials, containing a solid agar base (3% w/v) completely covered with a layer of live fermenting yeast supplemented with sucrose, allowing the females to lay eggs for 8 h. After three days, the larvae were washed out of the vials and used for the treatments.

Vanillin Co-treatment

The larvae were transferred into plastic vials containing 1.5g of *Drosophila* Instant Medium (Carolina Biological Supply Company, Burlington, NC, USA) re-hydrated with 5ml of the respective test solutions containing solvent alone (5% ethanol), mutagenic compound or vanillin solutions (0.5 or 1%) plus mutagen. The larvae fed on this medium until

the end of their development. After the end of metamorphosis period, two offspring genotypes emerged from the pupae: (i) marker-heterozygous (mwh/flr^3) and (ii) balancer heterozygous ($mwh/TM3$) flies. Their wings were mounted in Faure's solution on slides and scored (at 400X magnification) for the presence of cell clones showing malformed wing hairs: (i) single spots, either mwh or flr^3 , which can be produced by somatic point mutation, chromosome aberration, as well as mitotic recombination, and (ii) twin spots, consisting of both mwh and flr^3 subclones, which are originated exclusively from mitotic recombination [13]. On balancer-heterozygous wings, mwh single spots reflect predominantly somatic point mutation and chromosome aberration, since the presence of heterozygous inversions eliminates products of somatic crossing over.

Statistical analysis

The data were evaluated according to the multiple-decision procedure of Frei and Würzler [14], which makes possible to obtain four different diagnoses: positive, weakly positive, negative or inconclusive. The frequencies of each type of mutant clones per fly of a treated series were compared pair-wise (i.e., control vs. vanillin; genotoxin alone vs. genotoxin plus vanillin) using the conditional binomial test according to Kastembaum and Bowman [15]. Based on the control-corrected frequencies of clone formation per 10^5 cells, the percentages of vanillin interference were calculated as follows: $[(\text{genotoxin alone} - \text{genotoxin plus vanillin}) / \text{genotoxin alone}] \times 100$ [16].

Results and Discussion

The analyses of the antigenotoxic effects of VA in the wing SMART assay after chronic exposure to MNU, ENU, EMS and BLEO are shown in Table 1 - where the spot data are given for both *mwh/flr³* and *mwh/TM3* genotypes. In the trans-heterozygous genotype VA showed a weak inhibitory effect against MNU, ENU and BLEO. This effect was observed for all MNU- and ENU- spot categories considered, except for the frequencies of twin spots in the lowest dose of VA plus ENU. In relation to BLEO, the co-treatment with VA 0.5% showed statistically significant effects only for the frequency of total spots, although with VA 1% all spot classes – with exception of twin spots – presented significant decreases. Considering the *mwh/TM3* flies, VA has also shown a significant positive antimutagenic action against MNU, although the decrease observed for ENU and BLEO was expressed as weakly positive (Table 1). In this genotype, all recombinational events lead to unviable configurations that are eliminated because of the presence of the multiple inversions on the balancer chromosome. Thus, our data point out the antimutagenic VA action, at the same time that the positive decrease observed for twin spots - in the trans-heterozygous genotype - indicated the anti-recombinational activity of VA, since this category of spots is produced exclusively by mitotic recombination. The overall findings from the co-treatment series allows for VA general anti-genotoxicity, despite the obvious differences in the action mechanisms of the alkylating agents – represented by MNU and ENU – and the intercalating drug BLEO. In contrast, no differences were observed in the spot frequencies produced by EMS alone or in combination with VA (Table 1).

In fact, the desmutagenic activity exerted by VA is not entirely clear at present, being attributed to multiple mechanisms of action: antioxidant

activity, suppression of metabolic activation, as well as stimulation of detoxification - via induction of glutathione S-transferase [17, 18]. Hence, this flavoring compound, due to its powerful scavenger ability, may have the potential to prevent oxidative damage to DNA induced by BLEO - specially by its inhibitory effect on bleomycin-iron-dependent damage to DNA [19,20,21,22].

As previously demonstrated the post-treatment with VA had no effect on MNU- and ENU-mutagenicity in the SMART assay [12], as well as no modulator outcome on the mutagenic action of MNU in the Ames test [9]. However, when VA was applied as co-treatment a suppressed response was observed in both test systems, which speaks in favor of the VA interference in the steps that precede the induction of MNU- and ENU-DNA lesions. In fact, Takahashi et al. [9] proved that VA suppresses DNA methylation by MNU, which may be related to the role of VA in detoxification processes, and hence in modulating also the ENU genotoxicity - in spite of the absence of literature data concerning VA-modulator accomplishment against this ethylating agent.

CONCLUSIONS

In a previous report we demonstrated that neither ENU nor MNU mutagenicity and/or recombinagenicity were modified by the post-treatment with VA, indicating that this agent does not interfere in the mechanisms involved in MNU- and ENU-induced lesions processing. In contrast, EMS and BLEO-genetic toxicity was significantly enhanced - suggesting that the VA-modulator action is related to its synergistic effect on somatic recombination. Considering SMART as an assay able to detect most specifically mitotic crossing over, our data pointed out that VA

promotes homologous recombination via this specific event, at least in proliferative cells of *Drosophila* [12].

Currently our study concerning the effects of VA-co-treatment against these same genotoxins - previously tested in the post-treatment protocol - showed it has beneficial properties probably due to both its inhibitory effect on oxidative damage and its stimulator action on detoxification enzymes. The presence of VA in several food preparations as a sweetener or a flavor exhauster at concentrations that varied from 0.3 to 130 mmol/l [22], ultimately elevates the consumption of the compound. The use of VA as a natural supplement for the possible prevention of human diseases that may arise due to the enhanced DNA-lesions is per se a dangerous choice, specially because the VA is involved in the promotion of homologous mitotic recombination - faced as DNA repair mechanism involved in both loss of heterozygosity and genetic rearrangements[23]. The evidence that post-treatment with VA increased the frequency of HR events in parallel with its protective behavior in co-treatment protocols does not diminish the risks associated to its consumption.

Acknowledgements

This study was supported by the following Brazilian Agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Fundação e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- [1] L. Reddy, B. Odhav, K.D. Bhoola. Natural products for cancer prevention: a global perspective, *Pharmacol. Ther.* 99 (2003) 1-13.
- [2] N.J Walton, M.J. Mayer, A. Narbad. Molecules of interest. Vanillin, *Phytochemistry* 63 (2003) 505-515.
- [3] H. Imanishi, Y.F. Sasaki, K. Matsumoto, M. Watanabe, T. Ohta, Y. Shirasu, K. Tutikawa. Suppression of 6-TG-resistant mutations in V79 cells and recessive spot formation in mice by vanillin, *Mutat. Res.* 243(1990) 151-158.
- [4] H.H.R. Andrade, J.H. Santos, M.C .Gimmler-Luz, M.J.F. Correa, M. Lehmann, M.L. Reguly. Suppressing effect of vanillin on chromosome aberrations that occur spontaneously or are induced by mitomycin C in the germ cell line of *Drosophila melanogaster*, *Mutat. Res.* 279 (1992) 281-287.
- [5] L. Ferguson. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet, *Mutat. Res.* 307 (1994) 395-410.
- [6] H. Tsuda, N. Uehara, Y. Iwahori, M. Asamoto, M. Iigo, M. Nagao, K. Matsumoto, M. Ito, I. Hirono. Chemopreventive effects of β -carotene, α -tocopherol and five naturally occurring antioxidants on initiation of hepatocarcinogenesis by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the rat, *Jpn. J. Cancer Res.* 85 (1994) 1214-1219.
- [7] K. Akagi, M. Hirose, T. Hoshiya, Y. Mizogushi, N. Ito, T. Shirai. Modulating effects of elagic acid, vanillin and quercetin in a rat medium term multi-organ carcinogenesis model, *Cancer Lett.* 94(1995) 113-112.

- [8] T.M. Ohta, M. Watanabe, K. Watanabe, Y. Shirasu. Inhibitory effects of flavourings on mutagenesis induced by chemicals in bacteria, *Fd. Chem. Toxicol.* 24 (1986) 51-54.
- [9] K. Takahashi, M. Sekiguchi, Y. Kawazoe. Effects of vanillin and *o*-vanillin on induction of DNA-repair networks: modulation of mutagenesis in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.* 230 (1990) 127-134.
- [10] Y.F. Sasaki, H. Imanishi, T. Ohta, Y. Shirasu. Effects of antimutagenic flavourings on SCEs induced by chemical mutagens in cultured Chinese hamster cells, *Mutat. Res.* 189 (1987) 313-318.
- [11] J.H. Santos, U. Graf, M.L. Reguly, H.H.R. Andrade. The synergistic effects of vanillin on recombination predominate over its antimutagenic action in relation to MMC-induced lesions in somatic cells of *Drosophila melanogaster*, *Mutat. Res.* 444 (1999) 355-365.
- [12] M. Sinigaglia, M.L. Reguly, H.H.R. Andrade. Final VA-modulator effect as enhancements in EMS- and BLEO-crossing over in proliferative somatic cells of *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mol. Mutag.* (2004) *submitted*.
- [13] U. Graf, F.E. Würgler, A.J. Katz, H. Frei, H. Juon, C.B. Hall, P.G. Kale. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mutagen.* 6 (1984) 153-188.
- [14] H. Frei, F.E. Würgler. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result, *Mutat. Res.* 203 (1988) 297-308.
- [15] M.A. Kastembaum, K.O. Bowman. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutat. Res.* 9 (1970) 527-549.
- [16] S.K. Abraham. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination, *Mutagenesis* 9 (1994) 383-38.

- [17] V.S. Aboobaker, A.D. Balgi, R.K. Bhattacharya. *In vivo* effect of dietary factors on the molecular action of aflatoxin B₁: role of non-nutrient phenolic compounds on the catalytic activity of liver fractions, *In vivo* 8 (1994) 1095-1098.
- [18] M.A. Morse, L.A. Kresty, A.L. Toburen. Inhibition of metabolism of 4-(methylnitrosamine)-1-3-(pyridyl)-1-butanone by dietary benzaldehydes, *Cancer Lett.* 97 (1995) 255-261.
- [19] O.I. Aruoma, P.J. Evans, H. Kaur, L. Sutcliffe, B Halliwell. An evaluation of the antioxidant and potential pro-oxidant properties of food additives and of trolox C, vitamin E and probucol, *Free Rad. Res. Commun.* 10 (1990) 143-157.
- [20] J. Liu, A. Mori. Antioxidant and pro-oxidant activities of p-hydroxyl alcohol and vanillin: effects on free radicals, brain peroxidation and degradation of benzoate, deoxyribose, amino acids and DNA, *Neuropharmacol.* 32 (1993) 659-669.
- [21] T. Sawa, M. Nakao, T. Akaike, K. Ono, H. Maeda. Alkylperoxyl radical scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 397-402.
- [22] J.P. Kamat, A. Ghosh, T.P.A. Devasagayam. Vanillin as an antioxidant in rat liver mitochondria: inhibition of protein oxidation and lipid peroxidation induced by photosensitization, *Mol. Cell. Biochem.* 209 (2000) 47-53.
- [23] A.J.R. Bishop, R.H. Schiestl. Role of homologous recombination in carcinogenesis, *Exp. Mol. Pathol.* 74 (2003) 94-105.

Table I. Summary of results obtained in the wing spot test of *D. melanogaster*. Co-treatment series of MNU, ENU, EMS and BLEO in combination with vanillin (VA; 0.5 and 1 %). 48h feeding of 3-day-old standard cross larvae. Marker-trans-heterozygous (*mwh / flr³*) and balancer-heterozygous flies (*mwh / TM3*).

| Controls and compounds | MUT ^b (mM) | | No. of flies (N) | Spots per fly (no. of spots) statistical diagnosis ^a | | | | Total <i>mwh</i> clones ^e (n) | Mean <i>mwh</i> clone size class ^{e,f} | Clone induction frequencies (per 10 ⁵ cells per cell division) ^g (n/NC) ^{f,h} | Inhibi- tion ⁱ (%) |
|------------------------------|--------------------------|---|---------------------------|---|----------------|---------------|-----------------|---|---|--|-------------------------------------|
| | VA ^c (%) | Small single spots ^d (1-2 cells) | | Large single spots ^d (>2 cells) | Twin spots | Total spots | | | | | |
| Genotypes | | | | | | | | | | | |
| MNU | | | | | | | | | | | |
| <i>mwh / flr³</i> | 0 | 0 | 40 | 1.00 (40) | 0.30 (12) | 0.15 (6) | 1.45 (58) | 58 | 2.36 | 2.97 | |
| | 0.5 | 0 | 40 | 16.45 (658) | 13.78 (551) | 4.33 (173) | 34.55 (1382) | 1106 | 2.58 [2.60] | 56.66 [53.69] | |
| | 0.5 | 0.5 | 40 | 12.50 (500) w+ | 10.13 (405) w+ | 3.45 (138) w+ | 26.08 (1043) w+ | 847 | 2.58 [2.60] | 43.39 [40.42] | 24.72 |
| | 0.5 | 1.0 | 40 | 9.95 (398) w+ | 8.43 (337) w+ | 2.30 (92) w+ | 20.68 (827) w+ | 714 | 2.64 [2.67] | 36.58 [33.61] | 37.40 |
| <i>mwh / TM3</i> | 0 | 0 | 20 | 0.25 (5) | 0.00 (0) | j | 0.25 (5) | 5 | 1.40 | 0.51 | |
| | 0.5 | 0 | 20 | 13.55 (271) | 8.05 (161) | | 21.60 (432) | 432 | 2.20 [2.21] | 44.26 [43.75] | |
| | 0.5 | 0.5 | 20 | 8.25 (165) w+ | 3.75 (75) w+ | | 12.00 (240) + | 240 | 2.12 [2.14] | 24.59 [24.08] | 44.96 |
| | 0.5 | 1.0 | 20 | 7.55 (151) + | 3.50 (70) w+ | | 11.05 (221) + | 221 | 2.11 [2.13] | 22.64 [22.13] | 49.42 |

| ENU | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|------|-----|----|----------------|----------------|---------------|-----------------|------|-------------|---------------|-------|
| <i>mwh / flr³</i> | 0 | 0 | 40 | 0.63 (25) | 0.33 (13) | 0.15 (6) | 1.10 (44) | 39 | 2.56 | 2.00 | |
| | 0.5 | 0 | 40 | 15.43 (617) | 15.10 (604) | 4.63 (185) | 35.15 (1406) | 1169 | 2.71 [2.71] | 59.89 [57.89] | |
| | 0.5 | 0.5 | 40 | 13.75 (550) w+ | 11.45 (458) w+ | 4.25 (170) - | 29.45 (1178) w+ | 972 | 2.61 [2.61] | 49.80 [47.80] | 17.43 |
| | 0.5 | 1.0 | 40 | 12.30 (492) w+ | 10.35 (414) w+ | 3.18 (127) w+ | 25.83 (1033) w+ | 892 | 2.58 [2.58] | 45.70 [43.70] | 24.51 |
| BLEO | | | | | | | | | | | |
| <i>mwh / flr³</i> | 0 | 0 | 40 | 0.40 (16) | 0.05 (2) | 0.03 (1) | 0.48 (19) | 19 | 1.95 | 0.97 | |
| | 0.01 | 0 | 38 | 7.16 (272) | 0.63 (24) | 0.13 (5) | 7.92 (301) | 301 | 1.70 [1.69] | 16.23 [15.26] | |
| | 0.01 | 0.5 | 37 | 6.30 (233) - | 0.38 (14) - | 0.11 (4) - | 6.78 (251) w+ | 251 | 1.59 [1.57] | 13.90 [12.93] | 15.27 |
| | 0.01 | 1.0 | 37 | 6.03 (223) w+ | 0.32 (12) w+ | 0.08 (3) i | 6.43 (238) w+ | 238 | 1.53 [1.49] | 13.18 [12.21] | 19.99 |
| <i>mwh / TM3</i> | 0 | 0 | 40 | 0.25 (10) | 0.03 (1) | | 0.28 (11) | 11 | 1.45 | 0.56 | |
| | 0.01 | 0 | 39 | 2.72 (106) | 0.13 (5) | | 2.85 (111) | 111 | 1.42 [1.42] | 5.83 [5.27] | |
| | 0.01 | 0.5 | 40 | 2.00 (80) w+ | 0.10 (4) - | | 2.10 (84) w+ | 84 | 1.39 [1.38] | 4.30 [3.74] | 29.03 |
| | 0.01 | 1.0 | 40 | 2.08 (83) w+ | 0.00 (0) + | | 2.08 (83) w+ | 83 | 1.42 [1.42] | 4.25 [3.69] | 29.98 |

| | EMS | | | | | | | | | |
|------------------------------|------|-----|----|---------------|----------------|---------------|---------------|-----|-------------|-----------------|
| <i>mwh / flr³</i> | 0 | 0 | 10 | 0.40 (4) | 0.10 (1) | 0.00 (0) | 0.50 (5) | 5 | 2.42 | 2.46 |
| | 12.5 | 0 | 10 | 43.00 (430) | 33.70 (337) | 16.60 (166) | 93.30 (933) | 871 | 2.83 [2.84] | 178.48 [177.46] |
| | 12.5 | 0.5 | 10 | 47.70 (477) - | 32.30 (323) - | 17.80 (178) - | 97.80 (978) - | 891 | 2.62 [2.63] | 182.58 [181.56] |
| | 12.5 | 1.0 | 10 | 46.20 (462) - | 27.30 (273) w+ | 18.20 (182) - | 91.70 (917) - | 825 | 2.55 [2.56] | 169.06 [168.03] |
| <i>mwh / TM3</i> | 0 | 0 | 20 | 0.15 (3) | 0.00 (0) | ^j | 0.15 (3) | 3 | 1.33 | 0.31 |
| | 12.5 | 0 | 20 | 22.40 (448) | 6.80 (136) | | 29.20 (584) | 584 | 1.86 [1.86] | 59.84 [59.53] |
| | 12.5 | 0.5 | 20 | 20.40 (408) - | 7.10 (142) - | | 27.50 (550) - | 550 | 1.88 [1.88] | 56.35 [56.05] |
| | 12.5 | 1.0 | 20 | 21,80 (436) - | 5.20 (104) - | | 27.00 (540) - | 540 | 1.71 [1.71] | 55.33 [52.02] |

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würzler [1988] :+, positive; w+, weakly positive; -, negative P <0.05; ^b mutagen (2 h); ^cvanillin (48h); ^d including rare *flr³* single spots; ^econsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots; ^f number in square brackets are induction frequencies corrected for spontaneous incidence estimated from negative controls; ^g calculated according to Frei et al. [1992]; ^hC=48.800, i.e., approximate number of cells examined per fly; ⁱcalculated according to Abraham [1994] : (genotoxin alone – genotoxin plus VA/genotoxin alone)X 100; ^jonly *mwh* single spots can be observed in *mwh/TM3* heterozygotes as the balancer chromosome *TM3* does not carry the *flr³* mutation.

Capítulo IV

Discussão Geral



Quem nada ousa, não precisa de esperança
Johann Schiller

A última década foi marcada pelo avanço no entendimento do processo carcinogênico em nível celular e molecular, assim como pela obtenção de inúmeros dados experimentais centrados na prevenção ou inibição do câncer através de produtos, naturais ou sintéticos, presentes na dieta alimentar humana (Gerhäuser e cols., 2003). Mais de 600 compostos individuais e misturas complexas foram identificados e descritos em função do seu caráter antimutagênico - expresso em termos de decréscimos nas freqüências de eventos mutagênicos induzidos por genotoxinas específicas (Kassie e cols., 2003).

A mais de 20 anos a vanilina vem sendo descrita como uma substância promissora no combate ao câncer em função do seu efeito inibidor sobre eventos relacionados à indução e promoção do processo carcinogênico (Imanishi e cols., 1990; Ferguson, 1994; Tsuda e cols., 1994, Akagi e cols., 1995). Este espectro inibitório associado à ampla utilização da VA como flavorizante na indústria alimentícia - e conseqüente consumo elevado (Walton e cols., 2003) - despertaram o nosso interesse científico, resultando na publicação do primeiro trabalho associando a VA a acréscimos expressivos em eventos recombinacionais mitóticos. Em função das peculiaridades do bioensaio empregado - Teste para Detecção de Mutação e Recombinação (SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster* - foi possível demonstrar que, no que se refere às lesões induzidas pelo agente alquilante bifuncional MMC, a ação recombinogênica da VA causou um incremento na indução de permuta entre cromossomos homólogos da ordem de 190%. Concomitantemente, este aromatizante diminuiu em 79% a freqüência de mutações pontuais e cromossômicas. Outro ponto relevante refere-se a magnitude destes dois comportamentos antagônicos, ou seja promoção de recombinação e diminuição de eventos mutacionais. Quando a antimutagênese e a co-recombinogênese foram

avaliadas simultaneamente, a ação final da VA refletiu-se não como proteção, mas sim como um efeito potencializador expresso como um aumento de cerca de 200 vezes na genotoxicidade total da MMC. Conseqüentemente, pode-se inferir que tais incrementos devem-se basicamente a ação sinérgica da VA sobre a permuta genética (Santos e cols., 1999).

Pós-Tratamento

Na procura de respostas adicionais concernentes à ação da VA como modulador do processo de reparo envolvido na correção de diferentes espectros de lesões no DNA foi desenvolvida a presente Tese de Doutorado - utilizando três agentes alquilantes - N-etil-N-nitrosouréia (ENU), N-metil-N-nitrosouréia (MNU) e etilmetanosulfonato (EMS) - assim como o intercalante bleomicina (BLEO) avaliados através do bio-ensaio SMART. A mutagenicidade e a recombinogenicidade de ambos, ENU e MNU, não foram modificadas pela VA, o que sugere a sua não interferência nos mecanismos envolvidos na correção das lesões induzidas por estes alquilantes. Ao contrário, a toxicidade genética do EMS foi significativamente aumentada em valores compreendidos entre 7,79 a 29,79%, que representam a expressão final de dois efeitos antagônicos: (i) sinergismo em recombinação mitótica e (ii) proteção em relação à mutagênese.

Como explicar o fato de que a VA é capaz de modular a genotoxicidade do EMS mas não a do ENU, uma vez que ambos agentes induzem danos do tipo N-alquilações e O6-etilguanina, ainda que em diferentes proporções (Beranek, 1990). Através do uso de duas linhagens de *D. melanogaster* deficientes em mecanismos de reparação distintos -

mus201 (*ner*⁻) bloqueado no reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e *mus308* (*btm*⁻) deficiente no mecanismo de reparação translesão (*bypass*) – foi demonstrado que as correções dos danos induzidas pelo EMS e pelo ENU seguem dois mecanismos distintos. Em condições *ner*⁻, a frequência de quebras de DNA induzida pelo ENU é semelhante àquela encontrada na linhagem proficiente *ner*⁺. Este comportamento é oposto ao observado para as lesões produzidas pelo EMS – onde as quebras de cadeia de DNA são eficientemente reparadas no fenótipo selvagem *ner*⁺. Já em condições *btm*⁻, verifica-se uma clara resposta positiva - expressa pela manutenção das lesões induzidas por ambas genotoxinas - indicando o papel de *mus308* no processo de reparo dos danos induzidos pelo EMS e pelo ENU (Bilbao e cols., 2002). Assim, pode-se inferir que, apesar das lesões provocadas por estes agentes serem similares, o seu espectro mutagênico diferencial interfere no caminho de reparação a ser seguido. Desta forma, os nossos dados referentes à fraca antigenotoxicidade da VA em relação à ação genotóxica do EMS – expressa como co-recombinogênese e antimutagênese - bem como a ausência de efeito modulador deste flavorizante sobre as lesões induzidas pelo ENU é mais um subsídio a favor da surpreendente escolha de caminhos de reparação dependentes do espectro mutacional.

Outro ponto a ser considerado, refere-se aos dados prévios do nosso grupo de pesquisa (Santos e cols., 1999) relacionados à ausência de modulação da VA sobre a ação genotóxica do MMS, bem como os resultados do presente estudo, apontando para a não interferência da VA sobre as lesões induzidas pelo MNU. Estes dois agentes alquilantes induzem metilações especialmente na posição N-7 da guanina: (i) em condições *ner*⁻ ambos apresentam acréscimos nas frequências de quebras de DNA quando comparados a linhagem proficiente *ner*⁺, entretanto (ii) as

duas genotoxinas mostram a mesma resposta, independentemente de serem avaliadas nos genótipos *btm⁻* ou *btm⁺* (Bilbao e cols., 2002). Pode-se, pois, inferir que os danos provocados por estes agentes metilantes seguem a mesma via de reparação que não é suscetível ao efeito modulador mediado pela VA. Ao mesmo tempo verifica-se que o efeito potencializador da VA sobre eventos recombinacionais mitóticos está restrito ao EMS – o único dos agentes alquilantes monofuncionais estudados cujas lesões são processadas, em linhagens de *D. melanogaster*, por ambos mecanismos de reparo – excisão de nucleotídeos e pós-replicativo.

A VA também causou drásticos incrementos na genotoxicidade da BLEO - 120 a 178% - que estão limitados a aumentos em recombinação, uma vez que não foram observadas alterações na sua potência mutacional. Dois pontos devem ser primeiramente considerados para que possamos interpretar tais achados. O primeiro relaciona-se ao fato de que a genotoxicidade da BLEO deve-se basicamente à indução de quebras duplas associadas a sua ação como agente intercalante e indutor de radicais livres (Porvirk e Austin, 1991). O segundo, baseado nos recentes achados de Daboussi e cols. (2002), aponta para o fato de que tais tipos de danos são exclusivamente corrigidos por mecanismos de reparação dependentes de recombinação que podem ocorrer tanto entre cromossomos homólogos (HR) como não-homólogos (*end joining* - NHEJ). Associando a estas observações o fato de que o teste SMART privilegia a detecção de recombinação homóloga, os nossos dados indicam que a ação potencializadora de VA em relação a BLEO deve-se especificamente a incrementos em reparo dependente de HR. Ainda relevante é o fato de que estes acréscimos não estão associados a decréscimos em mutação, como anteriormente observado para a MMC. Tais diferenças podem ser

atribuídas ao fato de que ao contrário da BLEO as quebras de cadeia de DNA induzidas pela MMC devem-se a indução de bi-adições, que dependem da participação cooperativa do reparo de excisão – gerando quebras de DNA – e do subsequente fechamento via HR. Neste caso atribui-se as diminuições na incidência de mutação ao direcionamento das lesões mutagênicas para a via recombinacional – o que em última análise leva a acréscimo em recombinação mitótica, que são significativamente superiores aos decréscimos em eventos mutacionais.

Todos estes dados indicam que a modulação da VA está restrita ao seu efeito sinérgico sobre recombinação somática – promovendo especificamente a recombinação homóloga em células proliferativas de *Drosophila*. De fato, o papel fundamental da recombinação homóloga – visualizada como um mecanismo errante de reparo do DNA que pode levar a perda da heterozigose ou a rearranjos genéticos – na gênese de inúmeras doenças genéticas, incluindo o câncer, é por si própria nociva. Assim, considerando as evidências do presente trabalho de que o efeito modulador da VA está centrado no aumento da frequência de eventos relacionados à recombinação homóloga (HR) e associado-os a nossa exposição constante e diária a agentes genotóxicos endógenos, que também causam incrementos em HR, fica a advertência para o risco relacionado ao seu consumo.

Co-tratamento

Entretanto devemos considerar que tais respostas foram visualizadas no sistema de pós-tratamento, que se limita a fornecer resultados relacionados à interferência da VA quando as lesões já foram induzidas pelas diferentes genotoxinas – e como consequência estão limitadas a sua

interferência sobre os mecanismos de reparo relacionados não apenas ao tipo de lesão como também ao espectro mutagênico induzido no DNA das células somáticas.

Procurando ampliar o conhecimento sobre o efeito da VA em etapas que precedem a indução dos danos genotóxicos, utilizamos o sistema de co-tratamento – que privilegia a obtenção de dados relacionados à ação do modulador por interação direta com a genotoxina, por interferência nas enzimas relacionadas à metabolização dos mutágenos – via ativação e/ou detoxificação – assim como por outros processos que incluem atividade antioxidante por captação de radicais livres.

Neste procedimento ficou claro que a VA diminui significativamente a toxicidade genética total dos alquilantes MNU e ENU e do agente intercalante BLEO. Estes decréscimos foram observados tanto para mutação quanto para recombinação. Ao contrário, para o EMS não foram notadas alterações, já que as frequências de eventos mutacionais e ou recombinogênicos observadas no tratamento exclusivo com este agente ou em combinação com a VA não foram estatisticamente diferentes.

Ainda que a atividade desmutagênica da VA não esteja perfeitamente delineada, diferentes abordagens experimentais sugerem que esta ação está centrada em múltiplos mecanismos relacionados a sua propriedade antioxidante, assim como a sua interferência sobre a ativação metabólica e/ou detoxificação de genotoxinas específicas – neste último caso devido à indução de glutathione S-transferase (Aboobaker e cols., 1994, Morse e cols., 1995). De fato, este flavorizante tem sido caracterizado como um potente captador de radicais livres, especialmente em função do seu efeito sobre os danos oxidativos induzidos pela BLEO (Aruoma e cols., 1990; Liu e Mori, 1993; Sawa e cols., 1999; Kamat e cols., 2000) – o que explica os decréscimos observados no teste SMART.

Outro ponto relevante a ser considerado se refere à comparação dos resultados obtidos nos dois protocolos de tratamento empregados no presente trabalho. No sistema de pós-exposição à VA não interferiu sobre a genotoxicidade induzida tanto pelo MNU quanto pelo ENU – caracterizando a sua não interferência sobre os mecanismos envolvidos na reparação das lesões induzidas por ambos agentes alquilantes. Tais achados foram também observados por Takahashi e cols.(1990) quando analisaram a ação bio-antimutagênica da VA sobre os danos gerados pelo MNU, utilizando o teste de Ames. Por outro lado, quando estas mesmas genotoxinas foram avaliadas através do sistema de co-tratamento, observou-se uma marcada diminuição nas freqüências de eventos mutagênicos e recombinogênicos – caracterizando a interferência da VA, sobre a genotoxicidade destes dois agentes, como dependente de mecanismos que antecedem a indução das lesões no DNA celular. De fato, a atividade desmutagênica da VA em relação ao MNU está relacionada a decréscimos significantes no número de metilações presentes no DNA – que são basicamente atribuídas ao seu papel promotor sobre o processo de detoxificação (Takahashi e cols., 1990). A inexistência de trabalhos experimentais voltados para a obtenção de dados concernentes ao tratamento concomitante com VA e ENU não fornece embasamento para os resultados evidenciados no presente trabalho – ainda que possamos sugerir a participação de um mecanismo semelhante ao proposto para o MNU, que levaria a detoxificação do ENU e a conseqüente diminuição no número de etilações.

Já em relação a BLEO observamos efeitos antagônicos mais representativos, expressos como decréscimos na sua genotoxicidade - quando o parâmetro avaliado é a modulação da VA em etapas que precedem a indução das lesões - e acréscimos bastante representativos na

indução de recombinação mitótica homóloga, quando analisamos o efeito deste flavorizante sobre os danos já instalados no DNA. Efeitos diferentes dependentes do sistema de administração da VA são também evidenciados para o EMS – uma vez que no co-tratamento a VA não expressa efeito modulador e no pós-tratamento há um acréscimo significativo em recombinação homóloga.

Conclusões

A caracterização prévia da VA como um agente promissor na prevenção de danos genéticos, assim como sua potencial recomendação como quimiopreventivo são colocados em questionamento se considerarmos o conjunto de dados obtidos em *Drosophila*, especialmente aqueles alcançados através do pós-tratamento utilizando o teste SMART. Se por um lado à literatura relata o papel crucial da VA na diminuição dos danos mutacionais, sejam gênicos e/ou cromossômicos, por outro os nossos resultados apontam para a sua marcada participação como promotora de recombinação homóloga em células somáticas. Fica também claro que a despeito dos significativos decréscimos em mutação, o efeito final da VA – quando se consideram simultaneamente mutação e recombinação – é marcadamente a expressão de sinergismo em HR. Já a análise referente aos efeitos desmutagênicos da VA em relação a estas mesmas genotoxinas - mostrou propriedades benéficas provavelmente devido a dois dos seus efeitos principais: inibição dos danos oxidativos e ação promotora sobre enzimas de detoxificação.

Dentro do contexto risco-benefício pertinente a utilização de quimiopreventivos - caracterizados com base em informações obtidas em bioensaios que privilegiam a detecção de tipos específicos de efeitos

genéticos – fica clara a necessidade de avaliação da recombinação, acrescida da estimativa do efeito final em sistemas testes onde mutação e recombinação possam ser medidas simultaneamente. Dentro deste mesmo argumento, é também crucial que o provável quimiopreventivo seja avaliado em situações que permitam detectar a sua interferência nas diferentes etapas envolvidas na expressão final da genotoxicidade - associada a diferentes agentes mutagênicos.

Especificamente em relação à VA, - cujos níveis na dieta alimentar humana variam de 0,3 a 130mmol/l (Kamat e cols., 2000) – fica a indicação do seu envolvimento na promoção de recombinação homóloga, após a instalação dos danos genéticos e o seu efeito protetor em etapas que precedem a indução de lesões – condicionados a genotoxina específicas. Ainda que tenhamos um quadro mais amplo e preciso no que se refere ao efeito modulador da VA não podemos definitivamente quantificar a relação risco-benefício do seu consumo, uma vez que não se pode prever o quanto a sua presença concomitante com as genotoxinas – representado por efeito benéfico, via interferência no potencial genotóxico – ou a sua ação após a indução dos danos genéticos, através da promoção de reparo recombinacional entre cromossomos homólogos e aumento em HR, contribuem para a expressão final do seu efeito modulador.

Capítulo V

Bibliografia Geral



Começa a fazer tudo o que podes fazer, ou imaginas que possas.
A audácia traz em si o gênio, o poder e a magia.
Goethe

- Aaron CS and Leigh B (1981) X-ray induced sex-chromosome loss, when ring-X chromosome males are irradiated and mated to females carrying *mei-9*, *mei-41* or *mei-218*. *Mutat Res* 82:381-388.
- Aboobaker VS, Balgi AD and Bhattacharya RK (1994) *In vivo* effect of dietary factors on the molecular action of aflatoxin B₁: role of non-nutrient phenolic compounds on the catalytic activity of liver fractions. *In vivo* 8:1095-1098.
- Akagi K, Hirose M, Hoshiya T, Mizoguchi Y, Ito N and Shirai T (1995) Modulating effects of ellagic acid, vanillin and quercetin in a rat medium term multi-organ carcinogenesis model. *Cancer Lett* 94:113-121.
- Andrade HHR, Santos JH, Gimmler-Luz MC, Correa MJF, Lehmann M and Reguly ML (1992) Suppressing effect of vanillin on chromosome aberrations that occur spontaneously or are induced by mitomycin C in the germ cell line of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 279:281-287.
- Aruoma OI, Evans PJ, Kaur H, Sutcliffe L and B Halliwell (1990) An evaluation of the antioxidant and potential pro-oxidant properties of food additives and of trolox C, vitamin E and probucol. *Free Rad Res Commun* 10:143-157.
- Beranek DT (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* 231:11-30.
- Bilbao C, Ferreiro JA, Comendador MA and Sierra M (2002) Influence of *mus201* and *mus308* mutations of *Drosophila melanogaster* on the genotoxicity of model chemicals in somatic cells in vivo measured with the comet assay. *Mutat Res* 503:11-19.
- Bishop AJR and Schiestl RH (2003) Role of homologous recombination in carcinogenesis. *Exp Mol Pathol* 74:94-105.

- Daboussi F, Dumay A, Delacôte F and Lopez BS (2002) DNA double-strand break repair signalling: the case of RAD51 post-translational regulation. *Cell Signal* 14:969-975.
- Dashwood RH (2002) Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an 'A-to-Z' guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. *Mutat Res* 511:89-112.
- De Flora S (1998) Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 402:151-158.
- De Flora S and Ramel C (1998) Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. *Mutat Res* 202:285-306.
- Fearon ER and Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767.
- Feron VJ, Til HP, de Vrijer F, Woutersen RA, Cassee FR and van Bladeren PJ (1991) Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutat Res* 259:363-385.
- Ferguson L (1994) Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat Res* 307:395-410.
- Gerhäuser C, Klimo K, Heiss E, Neumann I, Gamal-Eldeen A, Knauff J, Liu G-Y, Sitthimonchai S and Frank N (2003) Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutat Res* 523-524:163-172.
- Gustafson DL, Franz HR, Ueno AM, Smith CJ, Doolittle DJ and Waldren CA (2000) Vanillin (3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde) inhibits mutation induced by hydrogen peroxide, *N*-methyl-*N*-nitrosoguanidine and mitomycin C but not ¹³⁷Cs γ -radiation at the *CD59* locus in human-hamster hybrid A_L cells. *Mutagenesis* 15:207-2113.
- Hagan EC, Hamsen WH, Fitzhugh OG, Jones PM, Taylor JM, Long EL, Nelson AA and Brouwer JB (1967) Food flavoring and compounds of related

- structure. II. Subacute and chronic toxicity. *Fd Cosmet Toxicol* 5:141-157.
- Hartman E and Shankel DM (1990) Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Environ Mol Mutagen* 15:145-182.
- Imanishi H, Sasaki YF, Matsumoto K, Watanabe M, Ohta T, Shirasu, Y and Tutikawa K (1990) Suppression of 6-TG-resistant mutations in V79 cells and recessive spot formation in mice by vanillin. *Mutat Res* 243:151-158.
- Inouye T, Sasaki YF, Imanishi H, Watanabe M, Ohta T and Shirasu Y (1988) Suppression of mitomycin C-induced micronuclei in mouse bone marrow cells by post-treatment with vanillin. *Mutat Res* 202:93-95.
- Ishidate M, Sofuni Jr T, Yoshikawa K, Hayashi M, Nohmi T, Sawada M and Matsuoka A (1986) Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food Chem Toxicol* 22:623-636.
- Jemal A, Thomas A, Murray T and Thun M (2002) Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 52:23-47.
- Kada T, Inouye T and Maniki M (1982) Environmental desmutagens and antimutagens. In: Kleokowsky EJ (ed) *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*, Praeger, New York, pp 1013-152.
- Kamat JP, Ghosh A and Devasagayam T.P.A (2000) Vanillin as an antioxidant in rat liver mitochondria: inhibition of protein oxidation and lipid peroxidation induced by photosensitization. *Mol Cell Biochem* 209:47-53.
- Kassie F, Sundermann VM, Edenharder R, Platt KL, Darroudi F, Lhoste E, Humbolt C, Muckel E, Uhl M, Kundi M and Knasmüller S (2003) Development and application of test methods for detection of dietary constituents which protect against heterocyclic aromatic amines. *Mutat Res* 523-524:183-192.

- Kasamaki A, Takahashi H, Tsumura N, Niwa J, Fugita T and Urasawa S (1982) Genotoxicity of flavoring agents. *Mutat Res* 105:387-392.
- Keshava C, Keshava N, Whong W-Z, Nath J and Ong T (1997/1998) Inhibition of methotrexate-induced chromosomal damage by vanillin and chlorophyllin in V79 cells. *Teratogen Carcinog Mutagen* 17:313-326.
- Keshava C, Keshava N, Ong T and Nath J (1998) Protective effects of vanillin on radiation-induced micronuclei and chromosomal aberrations in V79 cells. *Mutat Res*: 149-159.
- Kuroda Y and Inouye T (1988) Antimutagenesis by factors affecting DNA repair in bacteria. *Mutat Res* 202:387-391.
- Leigh B (1976) Ring chromosomes and radiation induced chromosome loss. In: Ashburner M and Novitski E (eds) *The Genetics and Biology of Drosophila*, Vol 1b, Academic Press, London, pp 505-528.
- Liu J and Mori A (1993) Antioxidant and pro-oxidant activities of p-hydroxyl alcohol and vanillin: effects on free radicals, brain peroxidation and degradation of benzoate, deoxyribose, amino acids and DNA. *Neuropharmacol* 32:659-669.
- Morse MA, Kresty LA and Toburen AL (1995) Inhibition of metabolism of 4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by dietary benzaldehydes. *Cancer Lett* 97:255-261.
- Ohta T (1993) Modification of genotoxicity by naturally occurring flavorings and their derivatives. *Crit Rev Toxicol* 23:127-146.
- Ohta T, Watanabe M, Watanabe K and Shirasu Y (1986) Inhibitory effects of flavourings on mutagenesis induced by chemicals in bacteria. *Food Chem Toxicol* 24:51-54.
- Ohta T, Watanabe M, Shirasu Y and Inouye T (1988) Post-replication and recombination in *uvrA umuC* strains of *Escherichia coli* are enhanced by vanillin, an antimutagenic compound. *Mutat Res* 201:107-112.

- Porvirk LF and Austin MJF (1991) Genotoxicity of bleomycin. *Mutat Res* 257:127-143.
- Reddy L, Odhav B and Bhoola KD (2003) Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol Ther* 99:1-13.
- Santos JH, Graf U, Reguly ML and Andrade HHR (1999) The synergistic effects of vanillin on recombination predominate over its antimutagenic action in relation to MMC-induced lesions in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 444:355-365.
- Sasaki, YF, Imanishi H, Ohta T and Shirasu Y (1987a) Effects of antimutagenic flavourings on SCEs induced by chemical mutagens in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res* 189:313-318.
- Sasaki, YF, Imanishi H, Ohta T and Shirasu Y (1987b) Effects of vanillin on sister-chromatid exchanges and chromosome aberrations induced by mitomycin C in cultured Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 191:193-200.
- Sasaki YF, Imanishi H, Watanabe M, Ohta T and Shirasu Y (1990a) Suppressing effect of antimutagenic flavorings on chromosome aberrations induced by UV-light or X-rays in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res* 229:1-10.
- Sasaki YF, Ohta T, Imanishi H, Watanabe M, Matsumoto K Kato T and Shirasu Y (1990b) Suppressing effects of vanillin, cinnamaldehyde, and anisaldehyde on chromosome aberrations induced by X-rays in mice. *Mutat Res* 243:299-302.
- Sato T, Chikazawa K, Yamamori H, Ose Y, Nagase H and Kito H (1991) Evaluation of the SOS chromotest for detection of antimutagens. *Environ Mol Mutagen* 17:258-263.
- Sawa T, Nakao M, Akaike T, Ono K and Maeda H (1999) Alkylperoxyl radical scavenging activity of various flavonoids and other phenoloc compounds:

- implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. *J Agric Food Chem* 47:397-402.
- Shaughnessy DT, Setzer RW and DeMarine DM (2001) The antimutagenic effect of vanillin and cinnamaldehyde on spontaneous mutation in *Salmonella* TA104 is due to a reduction in mutations at GC but not AT sites. *Mutat Res* 480-481:55-69.
- Smith PD, Baumen CF and Dusenbery RL (1983) Mutagen sensitivity of *Drosophila melanogaster*. IV. Evidence from the excision defective *mei-9^{AT1}* mutant for the timing of DNA-repair activity during spermatogenesis. *Mutat Res* 108:175-184.
- Takahashi K, Sekiguchi M, and Kawazoe Y (1990) Effects of vanillin and *o*-vanillin on induction of DNA-repair networks: modulation of mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mutat Res* 230:127-134.
- Tamai K, Tezuka H and Kuroda Y (1992) Different modifications by vanillin in cytotoxicity and genetics changes induced by EMS and H₂O₂ in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res* 268:231-237.
- Tsuda H, Uehara N, Iwahori Y, Asamoto M, Iigo M, Nagao M, Matsumoto K, Ito M and Hirono I (1994) Chemopreventive effects of β -carotene, α -tocopherol and five naturally occurring antioxidants on initiation of hepatocarcinogenesis by 2-amine-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the rat. *Jpn J Cancer Res* 85:1214-1219.
- Vogel EW, Dusenbery RL and Smith PD (1985) The relationship between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkylating agents in higher eukaryotic systems. IV. The effects of the excision-defective *mei-9^{L1}* and *mus(2) 201^{D1}* mutants on alkylation-induced genetic damage in *Drosophila*. *Mutat Res* 149:193-207.
- Vogel EW and Natarajan AT (1979) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher

eukaryotic systems. II. Total and partial sex-chromosome loss in *Drosophila*. *Mutat Res* 62:101-123.

Walton NJ, Mayer MJ and Narbad A (2003) Molecules of interest. Vanillin, *Phytochemistry* 63:505-515.

Watanabe K, Ohta T and Shirasu Y (1988) Antimutagenic effects of benzaldehyde and its derivatives on mutagenesis induced by 4-nitroquinoline-1-oxide in *Escherichia coli*. *Agric Biol Chem* 52:1041-1045.

Wattenberg LW (1985) Chemoprevention of cancer. *Cancer Res* 45:1-8.

Wattennberg LW (1990) Inhibition of carcinogenesis by naturally-occurring and synthetic compounds. In: Kuroda Y, Shankel DM and Waters MD (eds) *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanims II*. Plenum Press, New York, pp 155-166.

Zijlstra JA and Vogel EW (1988) The ratio of induced recessive lethals to ring-X loss has prognostic value in terms of functionality of chemicals mutagens in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 201:27-38.