

# **AVALIAÇÃO DA ANTIGENOTOXICIDADE DA VANILINA EM RELAÇÃO AOS DANOS INDUZIDOS PELA ETILNITROSOUREIA ATRAVÉS DO TESTE DE MICRONÚCLEOS IN VIVO**

ALEXANDRE GART REIMER<sup>1</sup>, JANAÍNA DIAS GODINHO<sup>1</sup>, VANDERLEI FARIAS GUERREIRO JUNIOR<sup>2</sup>, CAMILA APARECIDA MORAES MARQUES<sup>3</sup>, GRAZIELA ZANDONÁ<sup>1</sup>, MARIANA LEIVAS MÜLLER HOFF<sup>4</sup>, MARIALVA SINIGAGLIA<sup>4</sup>, MAURÍCIO LEHMANN<sup>5</sup>, MARIA LUIZA REGULY<sup>4</sup>, HELOÍSA HELENA RODRIGUES DE ANDRADE<sup>4,6</sup>

## **RESUMO**

*A vanilina (VA) é um agente flavorizante que em estudos de antigenotoxicidade tem mostrado efeitos contraditórios expressos como aumento ou diminuição na ação genotóxica de agentes químicos. Tais efeitos são dependentes não apenas da natureza da genotoxina como também do tipo de lesão que está sendo analisada. Neste trabalho foi avaliada a habilidade da VA modular a mutagenicidade do alquilante monofuncional N-etil-N-nitrosouréia (ENU), através do teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos. Os camundongos foram previamente tratados, via intraperitoneal com 50mg/kg de ENU. Passadas 6 horas receberam 250 e 500mg/kg de VA via gástrica. O pós-tratamento com VA não alterou as frequências de micronúcleos (MNPCEs) induzidas pelo ENU. Tais achados confirmam prévios*

---

<sup>1</sup> Acadêmico (a) do Curso de Biologia – Bolsista PROICT/ULBRA

<sup>2</sup> Acadêmico do Curso de Biologia – Bolsista PIBIC/CNPq - ULBRA

<sup>3</sup> Acadêmica do Curso de Biologia – Bolsista PROICTV/ULBRA

<sup>4</sup> Depto. de Genética, UFRGS, P. Alegre RS, Brasil.

<sup>5</sup> Professor do Curso de Engenharia Ambiental/ULBRA

<sup>6</sup> Professora – Orientadora do Curso de Biologia/ULBRA (heloisa@ulbra.br)

resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa, sugerindo que a exemplo do que acontece em *Drosophila melanogaster*, também em camundongos a VA não tem efeito sobre os mecanismos envolvidos na correção das lesões induzidas por este alquilante.

**Palavras-chave:** vanilina, antimutagenicidade, teste de micronúcleos.

## 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 of the mono-alkylating agent N-ethyl-N-nitrosourea was examined in vivo in the mouse micronucleus test. Vanillin (VA) was given orally to mice 6h after intraperitoneal injection of 50mg/kg ENU. Post-treatment with VA (250 e 500mg/kg) has no effect in the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) induced by ENU. This observation confirms our previous findings, suggesting VA has no effect on the mechanisms involved in the processing of ENU-induced lesions in *D. melanogaster*.

**Key words:** vanillin, antimutagenicity, mouse micronucleus test.

## INTRODUÇÃO

A possibilidade de modular a resposta das células à ação de genotoxinas particulares, especialmente através da dieta alimentar, abriu uma nova possibilidade para o controle do câncer - uma vez que fatores que influenciam a instabilidade genômica são alvos potenciais na prevenção da carcinogênese. De fato, o conceito de que a prevenção de doenças genéticas degenerativas está diretamente relacionada com a diminuição nas taxas de mutação é, comprovadamente, uma estratégia efetiva tanto para a modulação quanto para a prevenção destes processos patológicos (Reddy e cols, 2003). Entretanto, um ponto crucial a ser considerado relaciona-se ao fato de que um grande número de moduladores atua através de múltiplos me-

canismos podendo causar tanto proteção, quanto efeitos aditivos e/ou sinérgicos, dependentes da genotoxina avaliada.

A vanilina (VA) é um componente da dieta alimentar humana encontrada em uma grande variedade de produtos alimentícios, com uma média diária de consumo variando entre 11 a 38,9 mg/por pessoa. Diversos estudos apontam para o seu efeito protetor sobre múltiplos tipos de lesões induzidas por uma variedade de agentes químicos e físicos (Ohta, 1993; Andrade e cols.,1992; Ferguson e cols.,1994). No entanto, outros dados experimentais contradizem o seu efeito protetor, uma vez que a VA aumenta a incidência de parâmetros genéticos como trocas entre cromátides irmãs e recombinação mitótica (Santos e cols., 1999; Sinigaglia e cols., 2004).

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 nosso grupo de pesquisa procurou avaliar a ação bioantimutagênica da VA, em relação às lesões induzidas pela etilnitrosouréia (ENU), através do teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos, visando identificar a ação protetora da VA sobre eventos clastogênicos e aneugênicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Agentes Químicos

A vanilina (VA; CAS No. 121-33-5) foi obtida da Vetec Química Fina (São Paulo, Brasil). Este flavorizante foi dissolvido em 4% de tween 80 (Labsynth, Diadema – São Paulo, Brasil) e administrado aos animais em duas concentrações (250mg/Kg e 500mg/Kg).

O agente alquilante monofuncional, etilnitrosouréia (ENU; 759-73-9) foi obtido da Sigma (Saint Louis, MO) e diluído em NaCl 0,9%. O preparo das diluições foi realizado imediatamente antes do uso.

### Teste de Micronúcleos

Camundongos machos da linhagem CF1, com 7 a 8 semanas de idade, foram divididos em quatro grupos, com cinco animais em cada um deles. O grupo controle recebeu NaCl 0,9% (via

intraperitoneal), após 6hs foi administrado 4% de tween 80 (via gavagem). Os outros três grupos receberam previamente ENU 50mg/Kg, 6 horas depois foi administrado uma das seguintes soluções: 4% de tween 80, VA 250mg/Kg ou VA 500mg/Kg. Ao completar 24 horas de tratamento os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, a medula óssea foi removida. As lâminas foram fixadas e coradas com Giemsa. Foram avaliados 1000 eritrócitos policromáticos (PCEs) por animal.

O teste  $\chi^2$  foi utilizado para comparar estatisticamente as freqüências de micronúcleos induzidas pelo tratamento com ENU (controle positivo) com aquelas obtidas no pós-tratamento com VA - para avaliação da possível ação protetora da VA sobre as lesões previamente induzidas pelo ENU.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser observado na Tabela 1, as freqüências de MNPCEs induzidas pelo ENU não foram significativamente alteradas pelo tratamento com as duas concentrações de VA empregadas. Ainda que se observe uma diminuição na incidência de micronúcleos - nos indivíduos que receberam pós-tratamento com VA 500 mg/kg - este decréscimo não foi estatisticamente significante quando comparado ao controle positivo (ENU 50 mg/kg). Como consequência, pode-se inferir que a vanilina não possui atividade protetora, no que se refere aos danos induzidos pelo ENU: não alterando a fixação das lesões relacionadas à perda de fragmentos cromossômicos - clastogênese - e a perda de cromossomos inteiros - aneugênese. Tais achados estão de acordo com

resultados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa, quando o teste para detecção de Mutação e Recombinação em Células Somáticas (SMART) de *Drosophila melanogaster* foi utilizado - visando detectar a influência da VA sobre mutações pontuais, cromossômicas e recombinação mitótica induzidas por este agente alquilante. De fato, observou-se que o pós-tratamento com a VA não altera as frequências destes tipos de eventos genotóxicos, sugerindo que este flavorizante não interfere sobre os mecanismos envolvidos na correção das lesões induzidas pelo agente etilante ENU, em células somáticas de *Drosophila* (Sinigaglia e cols., 2004).

Cabe, no entanto, ressaltar que a utilização do bio-ensaio SMART evidenciou que a VA causa aumentos estatisticamente significantes na toxicidade genética induzida por outro agente etilante, o EMS – já que a toxicidade genética deste agente foi significativamente aumentada em valores compreendidos entre 7,79 a 29,79%, representando o efeito sinérgico da VA sobre a recombinação mitótica entre cromossomos homólogos. Tais achados sugerem que diferenças entre o espectro dos danos induzidos por estes dois agentes alquilantes (ENU e EMS), podem afetar os

caminhos de reparação a serem priorizados. Como consequência, o efeito potencializador da VA sobre recombinação homóloga (HR) foi 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.

## CONCLUSÕES

A análise estatística dos dados, através do teste de  $X^2$  revelou a ausência de diferenças significativas entre o controle positivo e os pós-tratamentos com VA. Como consequência a VA comporta-se como um agente destituído de atividade protetora no que se refere às lesões, relacionadas com a clastogênese e aneugênese, induzidas pelo ENU. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando o teste SMART em *Drosophila melanogaster*, confirmando a ausência de efeito bioantimutagênico da VA sobre as lesões induzidas por esta genotoxina.

**Tabela 1** - Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCEs) em medula óssea de camundongo, após tratamento com etilnitrosouréia (ENU) seguido de pós-tratamento com 2 diferentes concentrações de vanilina (VA – 250 e 500mg/kg).

Tratamentos	Frequência de MNPCEs (%)
	Média ± desvio padrão
Nacl 9% + tween 4%	0,36 ± 0,11
ENU 50 mg/kg + tween 4%	2,76 ± 0,70
ENU 50 mg/kg + VA 250 mg/kg	2,98 ± 0,80 <sup>ns</sup>
ENU 50 mg/kg + VA 500 mg/kg	1,98 ± 0,60 <sup>ns</sup>

<sup>ns</sup> não significante, quando os indivíduos tratados exclusivamente com ENU foram comparados aos pós-tratamento com VA. Teste de  $\tilde{O}^2$ ,  $\alpha$  0,05.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, H.H.R. et al. Suppressing effect of vanillin on chromosome aberrations that occur spontaneously or are induced by mitomycin C in the germ cell line of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 279, p.281-287, 1992.

FERGUSON, L. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. **Mutation Research**, v. 307, p. 395-410, 1994.

OHTA, T. Modification of genotoxicity by naturally occurring flavorings and their derivatives. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 23, p. 127-146, 1993.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v.99, p.1-13, 2003.

SANTOS, J.H. et al. The synergistic effects of vanillin on recombination predominate over its antimutagenic action in relation to MMC-induced lesions in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Resesearch**, v. 444, p. 355-365, 1999.

SINIGAGLIA, M.; REGULY, M.L.; ANDRADE, H.H.R. Final VA-modulator effect as enhancements in EMS- and BLEO-crossing over in proliferative somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 2004. Submitted.