



**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica**

**EFEITOS PROTETORES DO *Panax ginseng* C.A. Meyer SOBRE A
GENOTOXICIDADE DA DOXORRUBICINA EM CÉLULAS
SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster***

Aluna: Denise Gonçalves Pereira

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

**UBERLÂNDIA – MG
2008**



**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica**

**EFEITOS PROTETORES DO *Panax ginseng* C.A. Meyer SOBRE A
GENOTOXICIDADE DA DOXORRUBICINA EM CÉLULAS
SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster***

Aluna: Denise Gonçalves Pereira

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área de concentração: Genética).

**UBERLÂNDIA – MG
2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- P436e Pereira, Denise Gonçalves, 1965-
Efeitos protetores do *Panax Ginseng* C. A. Meyer sobre a genotoxicidade da doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster* / Denise Gonçalves Pereira. - 2008.
61 f. : il.
- Orientador: Mário Antônio Spanó.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Ginseng - Teses. 2. Mutagênese - Teses. 3. *Drosophila melanogaster* - Teses. I. Spanó, Mário Antônio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 633.88



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**EFEITOS PROTETORES DO *Panax ginseng* C.A. Meyer SOBRE A
GENOTOXICIDADE DA DOXORRUBICINA EM CÉLULAS
SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster***

Aluna: Denise Gonçalves Pereira

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó (Orientador)

Examinadores: Prof. Dr. Edson José Fragiorge
Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno
Prof. Dr. Luiz Carlos Guilherme
Prof^a Dr^a Sandra Morelli

Data da defesa: 25 de julho de 2008

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o formato da Tese foram contempladas.

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Rosenda Gonçalves Pereira e Sebastião Pereira (ele não mais presente fisicamente, mas vivo intensamente em meu coração), que são pessoas muito especiais em minha vida, que me ensinaram, educaram e orientaram para ser quem hoje sou e que são as razões da minha existência e da busca para ser sempre melhor. A vocês, meu amor eterno e meus agradecimentos por me indicarem o caminho da dignidade e da valorização da vida.

Agradecimentos

Há momentos que vão de alegrias a tristezas, de vitórias a derrotas. Mas em todos eles, tenho sempre a certeza da presença de Deus junto comigo, e só tenho motivos para agradecer pelo dom da vida, por tudo que ele me permitiu vivenciar e pela oportunidade de chegar até aqui, em mais uma etapa da minha existência.

Ao Prof. Dr. Mário Antônio Spanó, do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pela orientação, atenção e carinho. À você, minha admiração e respeito.

Ao Dr. Ulrich Graf, do Institute of Toxicology, ETH and University of Zürich, Schwerzenbach, Suíça, pelo fornecimento das linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*.

Ao Prof. Dr. Edson José Fragiorge, Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno, Prof. Dr. Luiz Carlos Guilherme e Prof^a Dr^a Sandra Morelli pela disponibilidade em participar da banca examinadora e pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Salvador de Carvalho, do Instituto de Biologia Geral da Universidade de Goiás, pela atenção, pelo apoio, pela parceria com o Laboratório de Mutagênese da UFG e pelas sugestões coerentes dadas a este trabalho.

Agradecimentos Especiais

Aos meus irmãos: Dalva, Sebastião, Nara e Neyla. Sobrinhos queridos: Thays, Marcelo, Rafael e João. Tios, tias e primos. A todos vocês, muito obrigado por todo apoio, compreensão e paciência em todos os meus momentos. Saibam que os amo muito.

Aos colegas do Laboratório de Mutagênese da UFG: Prof^a Dr^a Wanderlene Blanco Nunes, Prof^a MSc. Débora Cristina Silva dos Passos e Prof^a MSc. Kamylla da Silva Caldeira.

Aos colegas do laboratório de Mutagênese da UFU: Prof. Dr. Bruno Lassmar Bueno Valadares, Prof. Dr. Edson José Fragiorge, Prof^a Dr^a Neila Coelho de Sousa, Prof^a Dr^a Silmara de Moraes Pantaleão, Prof^a Dr^a Vânia Maria Sartini Dutra Pimenta, Prof^a Dr^a Zaira da Rosa Guterres e ao Sr. Paulo Roberto Moderno.

Ao colega, companheiro e amigo Prof. MSc. Alexandre Azenha Alves de Rezende, pela atenção, dedicação, apoio e carinho. Saiba que você Xandi é e será sempre uma pessoa muito especial para mim, muito obrigado.

Aos amigos Tereza do Carmo, Lúcia e Carlos Gomes da Silva por participarem da minha vida e que me ajudam a trilhar verdadeiramente o caminho daquele a quem tudo devo agradecer: Deus.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Mutagênese do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia-MG) com apoio financeiro das seguintes Agências de Fomento e Instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

LISTA DE ABREVIATURAS

BH	- <i>Balancer heterozygous</i> – heterozigoto balanceado
CAT	- Catalase
CYP	- Citocromo P-450
DDT	- Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DNA	- Ácido desoxiribonucléico
DOX	- Cloridrato de doxorubicina
FDA	- <i>Food and drug administration</i>
<i>flr</i>	- <i>Flare</i> - Pêlo mutante em forma de chama
GPX	- <i>Glutation peroxidase</i>
GSH – Px	- <i>Glutation reductase</i>
HB	- <i>High bioactivation cross</i>
MH	- <i>Marker heterozygous</i> – heterozigoto marcado
<i>mwh</i>	- <i>Multiple wing hairs</i> (pêlos múltiplos)
<i>ORR; flr</i>	- Linhagem <i>flare, oregon</i> resistente
PD	- Protopanaxadiol
<i>Pg</i>	- <i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer
PT	- Protopanaxotriol
ROS	- <i>Reactive oxygen species</i> ; espécies reativas de oxigênio
SMART	- <i>Somatic Mutation And Recombination Test</i>
SOD	- Superóxido desmutase
ST	- <i>Standard cross</i>

LISTA DE FIGURAS

Página

Capítulo 1

Figura. 1 Aspectos morfológicos externos do <i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer.....	9
Figura 2 – Aspectos morfológicos externos da raiz do <i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer.....	10
Figura 3. Estrutura química dos ginsenosídeos mais comuns.....	11
Figura 4. Estrutura química da doxorubicina.....	15
Figura 5. Macho de <i>D. melanogaster</i>	18
Figura 6. Ciclo de vida da <i>D. melanogaster</i>	20
Figura 7. Esquema representativo da asa de <i>D. melanogaster</i>	21
Figura 8. Esquema representativo dos cruzamentos <i>ST</i> e <i>HB</i>	23
Figura 9. Esquema representativo de descendente <i>MH</i> e <i>BH</i>	24
Figura 10. Diferentes protocolos de tratamento.....	25
Figura 11. Fotomicrografia de asa de <i>D. melanogaster</i>	26

LISTA DE TABELAS

Página

Capítulo 1

Tabela I. Mecanismos de inibição da mutagênese e/ou carcinogênese (De Flora e Ramel, 1988).....	5
--	---

Capítulo 2

Table 1. Summary of Results Obtained with the Drosophila Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) Progeny of the Standard (ST) Cross after Chronic Treatment of Larvae with <i>Panax ginseng</i> (Pg) and Doxorubicin (DOX).....	60
--	----

Table 2. Summary of Results Obtained with the Drosophila Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) Progeny of the High Bioactivation (HB) Cross after Chronic Treatment of Larvae with <i>Panax ginseng</i> (Pg) and Doxorubicin (DOX).....	61
--	----

SUMÁRIO

	Página
Apresentação.....	1
Capítulo 1	
1. Fundamentação Teórica.....	3
1.1 Genotoxicidade e câncer.....	3
1.2 Radicais livres.....	7
1.3 <i>Panax ginseng</i> (Umbellales, Araliaceae).....	9
1.4 Doxorubicina.(DOX).....	14
1.5 A <i>Drosophila melanogaster</i> (Díptera, Drosophilidae) como organismo teste.....	17
1.6. O teste para detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) em células de asas de <i>D. melanogaster</i>	20
2. Objetivos.....	26
3. Referências Bibliográficas.....	27
Capítulo 2	
Protective effects of <i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of <i>Drosophila melanogaster</i>	36
Abstract.....	37
Introduction.....	38
Material and Methods.....	41
Chemical agents.....	41
Strains and Crosses.....	41
Larval Feeding.....	42
Analysis of Adult Flies.....	42

Data Evaluation and Statistical Analysis.....	43
Results.....	44
Discussion.....	46
Acknowledgements.....	50
References.....	51
Table 1.....	60
Table 2.....	61

RESUMO

O *Panax ginseng* é um dos fitoterápicos mais amplamente prescritos para o tratamento de câncer, diabetes, inflamação crônica, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Desde que o uso de medicamentos alternativos, em combinação com a terapia convencional, pode aumentar o risco de interações indesejáveis, investigamos a possível genotoxicidade de uma forma solúvel em água de raízes secas de *P. ginseng* (2,5; 5,0 ou 10,0 mg/mL) e sua habilidade em proteger contra a genotoxicidade da doxorubicina (DOX; 0,125 mg/mL) utilizando o teste para detecção de mutação e recombinação somática em asas de *Drosophila melanogaster*, dos cruzamentos padrão e de alta capacidade de bioativação metabólica. *P. ginseng* não foi genotóxico nas concentrações utilizadas, enquanto que a genotoxicidade induzida pela DOX, nas moscas heterozigotas marcadas, resultou principalmente de recombinação mitótica. Nas menores concentrações, *P. ginseng* apresentou atividade antirecombinogênica, que foi independente da concentração do extrato utilizado. Eventos recombinacionais podem promover o aparecimento de câncer, porém pouco é conhecido sobre a capacidade do *P. ginseng* inibir a recombinação ou modular os mecanismos de reparo do DNA.

Palavras chave: Antigenotoxicidade; SMART; teste da mancha da asa.

ABSTRACT

Panax ginseng is one of the most widely prescribed herbal medicines for the treatment of cancer, diabetes, chronic inflammation, and neurodegenerative and cardiovascular diseases. Since the use of alternative medicines in combination with conventional therapy may increase the risk of unwanted interactions, we investigated the possible genotoxicity of a water-soluble form of the dry root of *P. ginseng* (2.5, 5.0 or 10.0 mg/mL) and its ability to protect against the genotoxicity of doxorubicin (DOX; 0.125 mg/mL) by using the *Drosophila melanogaster* wing somatic mutation and recombination test (SMART) with standard and high-bioactivation crosses of flies. *Panax ginseng* was not genotoxic at the concentrations tested, whereas DOX-induced genotoxicity in marker-heterozygous flies resulted mainly from mitotic recombination. At low concentrations, *P. ginseng* had antirecombinogenic activity that was independent of the concentration of extract used. Recombination events may promote cancer, but little is known about the ability of *P. ginseng* to inhibit such recombination or modulate DNA repair mechanisms.

Key words: Antigenotoxicity; SMART; wing spot test.

Apresentação

APRESENTAÇÃO

A investigação genotóxica/antigenotóxica de plantas tradicionalmente utilizadas na medicina popular é valiosa como medida de segurança para tratamentos fitoterápicos. Recentemente, essas plantas têm recebido grande atenção por serem agentes nutritivos com propriedades e efeitos medicinais, estimulando a saúde física e mental.

Durante os últimos anos, a utilização de plantas medicinais na medicina popular está se tornando cada vez mais promissora, devido ao fato de as mesmas apresentarem potencial antioxidativo, contra danos moleculares induzidos por espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo que a maior classe de agentes antioxidantes deriva de compostos fenólicos.

Modificações oxidativas são freqüentes no DNA de mamíferos e são consideradas importantes mecanismos na etiologia da carcinogênese, diabetes e outras patologias. Isso, porque as células são constantemente expostas a oxidantes metabólicos e a outras reações bioquímicas internas, bem como a fatores externos.

O Ginseng coreano (*Panax ginseng* C.A. Meyer - *Pg*) (Umbellales, Araliaceae) é tradicionalmente considerado como uma das mais importantes plantas medicinais com propriedades antioxidantes. Os ginsenosídeos (saponinas) são considerados como os componentes ativos mais importantes presentes nas raízes, sendo responsáveis por efeitos farmacológicos e fisiológicos importantes, tais como cardioprotetor, imunomodulador, antifadiga e hepatoprotetor.

A Doxorubicina (DOX) é um antibiótico antraciclínico, citotóxico e genotóxico (com efeitos mutagênicos e clastogênicos bem estabelecidos), obtido de culturas de *Streptomyces peucetius*, sendo amplamente utilizado na terapia antitumoral, inclusive de tumores sólidos.

Para avaliar os possíveis efeitos genotóxicos de uma forma solúvel em água de raízes secas de *Pg*, foi utilizado o teste para detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART), em células de asas de *Drosophila melanogaster*. Uma vez comprovado a

ausência de efeitos genotóxicos, o *Pg* foi avaliado com relação à sua ação protetora contra os efeitos genotóxicos da DOX.

A escolha do SMART em células somáticas de *D. melanogaster*, como método investigativo, foi devida ao fato do mesmo ser um teste rápido, de curta duração, baixo custo e permitir a detecção de uma amplitude de mutações de ponto, recombinações mitóticas, aberrações cromossômicas e não-disjunções cromossômicas. Outra razão que favoreceu a escolha do SMART, como meio de investigação, foi a possibilidade de avaliar a ativação metabólica dos componentes do *Pg* pelo sistema enzimático citocromo P450, que é o sistema enzimático responsável pelo metabolismo de agentes xenobióticos, presente na *D. melanogaster*.

Este trabalho pretende contribuir com informações para futuras descobertas sobre as propriedades do *Pg*, que ofereçam formas para tornar seu uso mais seguro.

Para a apresentação deste trabalho, o mesmo foi dividido em dois capítulos:

Capítulo 1 - Apresenta uma revisão geral da literatura, com informações sobre: genotoxicidade e a indução de doenças neoplásicas; Ginseng coreano (*Panax ginseng* C.A. Meyer); doxorubicina; a utilização da *D. melanogaster* em testes de genotoxicidade; assim como sobre o SMART.

Capítulo 2 - Apresenta o manuscrito intitulado "Protection by *Panax ginseng* C.A. Meyer against the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*" aceito para publicação na revista Genetics and Molecular Biology (GMB - MS2007/281), o qual demonstra que, nas condições experimentais utilizadas, o *Pg* não possui efeitos genotóxicos. A genotoxicidade induzida pela DOX nas moscas heterozigotas marcadas (MH) foi principalmente devida à recombinação mitótica. O *Pg* em menores concentrações atua como agente antirecombinogênico; e indica ausência de correlação dose-resposta, desde que o aumento na concentração de *Pg* não resulta em aumento proporcional na redução da mutagenicidade da DOX.

Capítulo 1

Fundamentação Teórica

1. Fundamentação Teórica

1.1 Genotoxicidade e câncer

No decorrer da vida, o DNA sofre mutações que podem ser causadas por erros durante a duplicação do DNA, na divisão celular. Os agentes mutagênicos, que alteram as seqüências de bases no DNA podem acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias. Assim sendo, os mecanismos de mutagênese e carcinogênese parecem estar intrinsecamente ligados. Após passar por várias divisões, uma célula poderá acumular mutações que, se em número elevado, poderão determinar a perda do controle de sua divisão, determinando, assim, o aparecimento do câncer (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

A indução de aberrações cromossômicas por agentes genotóxicos (clastogênicos) ambientais também está relacionada com a indução de neoplasias (GEBHART, 1992).

Além das mutações de ponto e das aberrações cromossômicas, a presença de mitoses atípicas foi atribuída como uma das causas da divisão descontrolada e rápida de células neoplásicas. Tem sido observado também que alterações nos centrômeros acontecem freqüentemente em neoplasmas malignos. Acredita-se que elas contribuam para a instabilidade genética, presente em células cancerosas (BATISTAU, 2004).

Ultimamente, as atenções têm sido voltadas para os eventos intracelulares associados com a transformação maligna da célula, com iniciação em nível molecular. A identificação de uma série de oncogenes, genes supressores de tumor, e uma cascata de sinais reguladores da expressão gênica e de ativação, poderia ser uma alternativa preventiva, bem como, estratégia terapêutica para reduzir o risco de câncer humano (PARK; SURH, 2004). O gene supressor de tumor P53 é um guardião do genoma, tendo função de proteger o DNA celular de uma variedade de danos induzidos por agentes carcinogênicos, bloquear a proliferação celular anormal, induzir o reparo do DNA, eliminar células danificadas e induzir apoptose (PARK; SURH, 2004).

Estudos recentes têm demonstrado que cânceres humanos podem ser prevenidos quando se evita a exposição aos carcinógenos, ou quando alguns fatores protetores modulam o mecanismo de defesa do organismo contra agentes mutagênicos (antimutagênicos) (POOL-ZOBEL *et al.*, 2005), como por exemplo, vários constituintes da dieta, que são importantes na prevenção do câncer (anticarcinogênicos), por favorecerem a biotransformação moduladora de carcinógenos (DASGUPTA *et al.*, 2004).

Antimutagênicos são fatores que reduzem o produto de mutações espontâneas e/ou induzidas, podendo ser classificados em dois tipos, de acordo com o mecanismo de ação: 1) Desmutágenos - são agentes que reduzem o efeito genotóxico/mutagênico do agente xenobiótico, interagindo diretamente com o mutágeno, ou bloqueando seus efeitos, inibindo completamente sua ativação metabólica, ou aumentando sua detoxificação; 2) Bioantimutagênicos – são agentes que agem depois da ocorrência do dano, promovendo reparo do DNA, aumentando a fidelidade da replicação do DNA, inibindo os erros inclinados à replicação ou suprimindo o crescimento e a replicação de células com DNA danificado (ANDRADE *et al.*, 1992; MERSCH-SUNDERMANN *et al.*, 2004).

Pesquisas básicas, aplicadas em estudos de clastogenicidade, não só revelaram os mecanismos de indução das aberrações cromossômicas por mutágenos ambientais, como também contribuíram com idéias efetivas para o emprego de práticas preventivas, reduzindo o risco para os indivíduos. Assim, a anticlastogênese é uma parte essencial da antimutagênese e da anticarcinogênese. Os anticlastogênicos são agentes que podem reduzir os danos ao cromossomo, induzidos por clastógenos que se caracterizam por serem substâncias que causam prejuízos diretos ao cromossomo. Assim sendo, os anticlastogênicos diminuem a probabilidade de câncer em populações expostas a esses agentes (GEBHART, 1992).

A quimioprevenção do câncer pode ser feita por meio do uso de agentes de ocorrência natural ou sintética, com o objetivo de prevenir, inibir ou reverter o processo de carcinogênese (SPORN *et al.*, 1976; POOL-ZOBEL *et al.*, 2005).

De Flora e Ramel (1988) apresentam uma classificação detalhada a respeito dos mecanismos de ação dos inibidores de mutagênese e/ou carcinogênese (**Tabela I**).

Tabela I. Mecanismos de inibição da mutagênese e/ou carcinogênese (DE FLORA; RAMEL, 1988)

1. Inibidores da mutagênese com atuação extracelular:

1.1. Inibidores da captação dos mutágenos ou de seus precursores

1.1.1. Impedem a sua penetração

1.1.1.1. Dentro do organismo

1.1.1.2. Dentro da célula

1.1.2. Favorecem a sua remoção

1.2. Inibidores da formação endógena do mutágeno

1.2.1. Inibem a reação de nitrosação

1.2.2. Modificam a flora microbiana intestinal

1.3. Desativadores do mutágeno

1.3.1. Por reação física

1.3.2. Por reação química

1.3.3. Por reação enzimática

2. Inibidores de mutagênese com atuação intracelular:

2.1. Moduladores do metabolismo

2.1.1. Inibem a duplicação celular

2.1.2. Favorecem a captação do mutágeno por células não alvo

2.1.3. Inibem a ativação de pré-mutágenos

2.1.4. Induzem os mecanismos de desintoxicação

2.2. Bloqueadores de moléculas reativas

2.2.1. Reagem com sítios eletrofílicos

2.2.1.1. Por reação química

2.2.1.2. Por reação enzimática

2.2.2. Captam espécies reativas de oxigênio

2.2.3. Protegem sítios nucleofílicos de DNA

2.3. Moduladores da duplicação e reparo do DNA

2.3.1. Aumentam a fidelidade da duplicação do DNA

2.3.2. Favorecem o reparo das lesões do DNA

2.3.3. Inibem o reparo indutor de erros

3. Inibidores atuando na iniciação ou em células neoplásicas

3.1. Moduladores de promoção tumoral

3.1.1. Inibem os efeitos genotóxicos

3.1.2. Captam radicais livres

3.1.3. Inibem proliferação tumoral

3.1.4. Induzem a diferenciação tumoral

3.1.5. Modulam o sinal de tradução

3.2. Moduladores de progressão tumoral

3.2.1. Inibem os efeitos genotóxicos

3.2.2. Atuam nos hormônios ou nos fatores de crescimento

3.2.3. Atuam no sistema imune

3.2.4. Agentes anti-neoplásicos físicos, químicos ou biológicos

3.2.5. Modulam o sinal de tradução

A utilização de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos têm aumentado nos últimos anos, principalmente pelos portadores de doenças crônicas. No entanto, as plantas medicinais e os medicamentos fitoterápicos são caracterizados por uma mistura complexa de componentes químicos, podendo apresentar diversos mecanismos de ação. Quando administrados concomitantemente, podem interagir com diversos fármacos, alterando sua eficácia e segurança (ALEXANDRE *et al.*, 2008).

Vários constituintes naturais têm recebido atenção devido ao seu potencial antioxidante. Dietas ricas em antioxidantes naturais estão sendo associadas à prevenção e/ou tratamento de diferentes patologias, tais como a aterosclerose. Dentre os componentes bioativos dos alimentos com propriedades antioxidantes encontram-se as vitaminas E e C, polifenóis, carotenóides - principalmente o licopeno e o caroteno (KALIORA *et al.*, 2006).

O uso de plantas contendo flavanóides tem aumentado a demanda pelo consumo por compostos de origem natural, e chamado a atenção para dietas com plantas contendo essa classe de moléculas, como compostos naturais quimiopreventivos do câncer (DI MAMBRO; FONSECA, 2005).

1.2 Radicais livres

Radicaís livres são moléculas instáveis, pelo fato de seus átomos possuírem um número ímpar de elétrons. Os radicaís livres atuam como agentes oxidantes, pois tendem a adquirir elétrons para sua estabilização (PICADA *et al.*, 2003).

Esses radicaís são muito instáveis e reagem rapidamente com outros grupos ou substâncias no organismo, levando a uma lesão da célula ou tecido. Moléculas celulares, como proteínas, lipídios e, em particular, o DNA, são alvos naturais de oxidação. Danos oxidativos ao DNA podem levar às mutações, quebras de fitas simples e duplas e, eventualmente, à morte celular (POULSEN, 2005).

Para radicaís livres derivados do oxigênio, é utilizado o termo “espécies reativas de oxigênio” (*reactive oxygen species – ROS*). Dentre os quais podem se destacar o radical hidroxil (OH^\bullet), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), e o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (JI, 1995). Além disso, determinadas espécies químicas, tais como certos metais de transição (ferro, cobre, chumbo, e outros) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), embora não se constituam radicaís livres (não possuem elétron desemparelhado), podem participar de reações que levam à produção de radicaís livres, sendo, portanto, chamadas de pró-oxidantes (YU, 1994).

Radicaís livres e ROS são normalmente gerados *in vivo*, como consequência da cadeia respiratória, a qual converte o oxigênio molecular em água (CHEN *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2007). Fatores externos como radiações ionizantes e não ionizantes, gases naturais tóxicos como ozônio, assim como produtos químicos e toxinas oriundos da exposição ocupacional e da dieta, também induzem a formação dessas moléculas (HALLIWELL; ARUOMA, 1991; LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007).

Sob condições normais, os radicaís livres, de uma maneira geral, são eliminados pelo sistema de defesa antioxidante (KIM *et al.*, 2007), o qual inclui as enzimas como a superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPX), glutathiona redutase (GSH) (DASGUPTA *et al.*, 2004). Mas quando há um desequilíbrio entre a formação excessiva de ROS e sua eliminação

pelo sistema de defesa antioxidante, ocorre um fenômeno chamado de estresse oxidativo (DRODGE, 2002).

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o importante papel do estresse oxidativo no aparecimento e desenvolvimento de inúmeras doenças (LI *et al.*, 2008) como envelhecimento precoce, doenças neurodegenerativas (BALU *et al.*, 2005), carcinogênese (DASGUPTA *et al.*, 2004; POULSEN, 2005) e o diabetes (LI *et al.*, 2008).

No sentido de minimizar os danos provocados por ROS e outros radicais livres, têm se procurado aumentar a ingestão de antioxidantes (JUNG *et al.*, 2006). O termo antioxidante refere-se a uma grande variedade de compostos com mecanismos de ação distintos. De acordo com Kaliora *et al.* (2006), "antioxidante" refere-se a qualquer molécula capaz de estabilizar ou desativar radicais livres antes que eles ataquem as células.

Dentre os antioxidantes de origem natural estão aqueles que são oriundos do metabolismo secundário de algumas plantas. Estas substâncias são produzidas em pequenas quantidades e, ao contrário dos produtos do metabolismo primário, nem sempre estão envolvidos em funções vitais do vegetal (ALVES, 2001).

1.3 *Panax ginseng* (Umbellales, Araliaceae)

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Sub-classe: Rosidae

Ordem: Umbellales

Família: Araliaceae

Gênero: *Panax* L.

Espécie: *Panax ginseng* C. A. Meyer

(CRONQUIST, 1988)

O *Panax ginseng* C. A. Meyer é um suplemento herbáceo popular, usado no mundo inteiro e que tem muitos efeitos benéficos à saúde devido à presença de altos níveis de ginsenosídeos (ALI *et al.*, 2005a). A raiz de *P. ginseng* é amplamente prescrita e intensivamente estudada como uma erva medicinal (CHO *et al.*, 2008).

O *P. ginseng* é uma das mais valiosas ervas de origem oriental (JEONG *et al.*, 2006; PERSSON *et al.*, 2006), com distribuição predominante em 3 zonas de expansão, localizadas na região Indo-malaia, Austrália e América tropical, com mais de 10 diferentes espécies do gênero *Panax*. O ginseng é um arbusto antigo cuja raiz necessita de um tempo que varia de 4 a 6 anos de cultivo, até amadurecer (PEIXOTO, 1982).

As espécies pertencentes a esta família caracterizam-se por serem herbáceas, lenhosas ou arbustivas, com folhas simples, com flores pequenas, reunidas em inflorescências axilares hermafroditas, tetra ou pentâmeras, que apresentam resistência às intempéries, não despindo suas folhas no inverno, como acontece com a maioria das Bignoniáceas, Bombaceae, Leguminosas, Euphorbiaceae e outras (**Figura 1**).



Figura. 1 Aspectos morfológicos externos do *Panax ginseng* C. A. Meyer <http://www.erboristeriaveterinaria.it/news_dettaglio_stsd.asp?idn=189&idm=155&anno=&mese=&titolo=GINSENG%20-%20PANAX%20GINSENG%20CA%20MEYER&idanagrafica=112> acessado em 25 de junho de 2008.

O Ginseng é tradicionalmente considerado como uma das mais importantes plantas medicinais (YU *et al.*, 2005), cuja raiz (**Figura 2**) é usada como remédio tradicional na Ásia, por mais de 2000 anos (JIN *et al.*, 2006). Possui efeitos cardiovasculares, imunes, endócrinos, podendo também atuar no sistema nervoso (OLIVEIRA *et al.*, 2005), na prevenção da perda de memória (JIN *et al.*, 1999), bem como anti-estresse (LEE *et al.*, 2006). Muitos pesquisadores têm atuado na elucidação da sua ação farmacológica, por meio de técnicas bioquímicas e de biologia molecular (LEE *et al.*, 2003).



Figura 2 - Aspectos morfológicos externos da raiz do *Panax ginseng* C. A. Meyer <<http://www.ferato.com/wiki/index.php/Ginseng>> acessado em 25 de junho de 2008.

O ginseng contém saponinas, antioxidantes, peptídeos, proteínas, polissacarídeos, álcool poliacetilênicos, ácidos graxos e minerais (JIN *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Os ginsenosídeos agem como agentes tônicos em pacientes com câncer, reduzindo os efeitos causados pela terapia convencional (ZHANG, 2008). Estudos fitoquímicos e farmacológicos com plantas sugerem que os constituintes químicos do ginseng, que contribuem para os seus efeitos farmacológicos, são as saponinas de triterpenos. Estes compostos são chamados ginsenosídeos Rx, de acordo com a sua mobilidade, com a polaridade decrescendo do índice "a" a "h". Esta propriedade é função do número de

resíduos de monossacáridos na cadeia de açúcar. As agliconas destes compostos são o protopanaxodiol e o protopanaxotriol - ambos têm um esqueleto de damareno. Até aos dias de hoje já foram isolados 31 ginsenosídeos diferentes das raízes de várias espécies de ginseng (SUN *et al.*, 2004; JEONG *et al.*, 2006).

Os ginsenosídeos têm diferentes efeitos biológicos, dependendo das suas estruturas químicas, que são similares (JIN *et al.*, 1999). As estruturas químicas consistem de núcleos esteróides, com 17 átomos de carbono, arranjados em 4 anéis (RADAD *et al.*, 2004), sendo classificados em dois grandes grupos, de acordo com a posição em que os açúcares são encontrados: protopanaxadiol, açúcar encontrado no anel triterpeno na posição 3 (PD; ginsenosídeo Rg₃, Rb₁, Rb₃ Rh₂, Rc e Rd); protopanaxotriol encontrado na posição 6 do triterpeno (PT; ginsenosídeos Re, R1, Rh1, Rg1 e Rg2) (Liu *et al.*, 2003) (**Figura 3**).

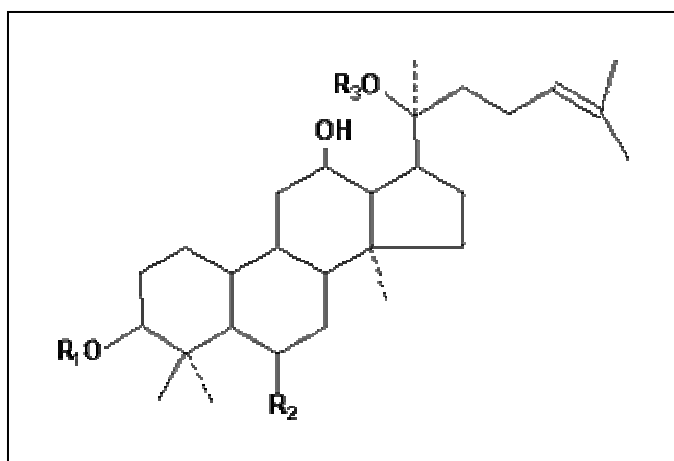


Figura 3. Estrutura química dos ginsenosídeos mais comuns <<http://www.dq.fct.unl.pt/qoa/qpn1/2002/ginseng/GINSENG/princ%EDpios.htm>> acessado em 25 de junho de 2008.

Vários estudos revelaram efeitos benéficos dos ginsenosídeos, como: ação farmacológica dos ginsenosídeos Rb₁ e Rg₁ como antipiréticos, aumentando a mobilidade gastrointestinal, acelerando a glicólise e agindo na inibição da síntese do colesterol (RADAD, 2004). O papel do Rh₁, como receptor de estrógenos,

glicocorticóides, andrógenos e ácidos retinóico, por ligação transmembrana, possivelmente é favorecida pela sua propriedade hidrofóbica e subsequente ativação da sinalização (LEE, 2003).

As saponinas apresentaram também potencial antígeno tóxico *in vitro* (RHEE *et al.*, 1990; LEE *et al.*, 1998); imunológico junto aos antígenos, nas respostas humoral e celular (SUN *et al.*, 2004), antiinflamatória, antioxidante (KIEFER; PANTUSO, 2002; ALI *et al.*, 2005b; JUNG *et al.*, 2005), anticâncer (KIM; PARK, 2003), neuroprotetora e neurotrófica (RADAD *et al.*, 2004), antidiabética (KUO *et al.*, 2003), cardioprotetora, imunomoduladora, antifadiga, hepatoprotetora, além de outros efeitos fisiológicos e farmacológicos (TANG; EISENBRAND, 1992, apud YU *et al.*, 2005).

1.4 Doxorrubicina (DOX)

A adriamicina (Doxorrubicina - DOX), assim como daunorrubicina, são antibióticos antraciclínicos citotóxicos e genotóxicos (TREVISAN; POPPI, 2003; COSTA; NEPOMUCENO, 2006; FRAGIORGE *et al.*, 2007; VALADARES *et al.*, 2008), obtidos de culturas de *Streptomyces peucetius* ATCC 29050, sendo controlados transcricionalmente por três proteínas regulatórias DnrL, DnrN e DnrO (JIANG; HUTCHINSON, 2006) e amplamente utilizados na terapia tumoral (KALENDER *et al.*, 2005) em uma grande série de neoplasmas humanos, incluindo tumores sólidos (TREVISAN; POPPI, 2003).

A DOX é uma molécula anfifílica que tem um núcleo naftacenediona fluorescente no C7, ligado a uma cadeia lateral aminoglicosídica hidrofílica (Figura 4).

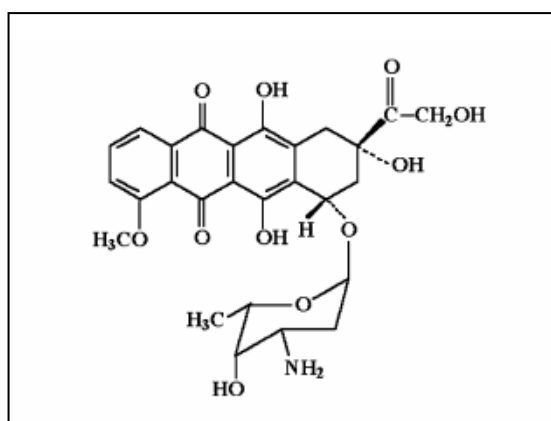


Figura 4. Estrutura química da doxorrubicina (TREVISAN; POPPI, 2003).

A DOX tem como mecanismo de ação a intercalação no DNA, a inibição da enzima topoisomerase (LEHMAN *et al.*, 2003) e a produção de radicais livres (KALENDER *et al.*, 2005).

A DOX não somente aumenta a produção de radicais livres no tecido, mas também diminui sua habilidade para reações de detoxificação das espécies reativas de oxigênio (KALENDER *et al.*, 2005). Acredita-se que os radicais livres

estejam envolvidos no mecanismo de citotoxicidade da DOX contra uma variedade de tumores, variando de acordo com o tipo de câncer (KALENDER *et al.*, 2005).

São descritos dois caminhos diferentes para a produção de radicais livres por DOX: I) formação de radicais livres semiquinona, pela ação de redutases que produzem a redução de um elétron da DOX, para corresponder à DOX semiquinona. II) os radicais livres da DOX atuam por um mecanismo não enzimático, que envolve reação com ferro. Por exemplo, o Fe^{3+} reage com DOX em uma reação redox. O átomo de ferro aceita um elétron, forma-se o complexo Fe^{2+} - DOX, e radicais livres são produzidos (KALENDER *et al.*, 2005). O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pode também causar rompimento da camada lipídica e da organização estrutural da membrana, alterando sua fluidez e permeabilidade (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

A administração de DOX, para tratamento de vários tumores humanos, causa uma cardiopatia dose dependente cumulativa (ZHOU *et al.*, 2001), devido á disruptura no metabolismo basal do tecido cardíaco (KALENDER *et al.*, 2005). O mecanismo de cardiotoxicidade induzida por DOX é atribuído à geração de radicais livres, estimulação de peroxidação lipídica e, subsequente alteração da integridade da membrana celular, mediada pela alteração da função mitocondrial, em função da geração de radicais livres (ZHOU *et al.*, 2001).

A DOX gera radicais semiquinona, que reagem com o oxigênio molecular, produzindo outros radicais livres, em um estágio precoce após a administração, bem como há uma redução na catalase (CAT) e glutathion peroxidase (GSH – Px) (YAGMURCA *et al.*, 2004).

A nefrotoxicidade é também um dos importantes efeitos dos antibióticos antraciclínicos. A terapia anticâncer usualmente altera a homeostase, durante o tratamento do câncer, em diferentes órgãos (YAGMURCA *et al.*, 2004).

Vários estudos, com emprego de diferentes substâncias químicas, têm sido realizados para verificar a ação das mesmas contra o efeito cardiotóxico e genotóxico da DOX. Uma formulação poliervas, o Cardipro, reduziu a cardiotoxicidade induzida por DOX, sendo a mesma associada a danos teciduais gerados por radicais livres (MOHAN *et al.*, 2006). A própolis de *Apis mellifera* protegeu células de asas de *Drosophila melanogaster* contra a ação mutagênica da DOX (VALADARES *et al.*, 2008).

1.5 A *Drosophila melanogaster* (Díptera, Drosophilidae) como organismo teste

Reino: Animalia.

Filo: Arthropoda.

Classe: Insecta.

Ordem: Diptera.

Subordem: Brachycera.

Família: Drosophilidae.

Gênero: *Drosophila*.

Espécie: *D. melanogaster*.

A *D. melanogaster* (**Figura 5**) foi, por muito tempo, conhecida como mosca-da-fruta. Entretanto, essa nomenclatura já não é mais utilizada por referir-se mais apropriadamente às moscas da família Tephritidae, que causam prejuízo aos fruticultores (WIKIPÉDIA, 2008).

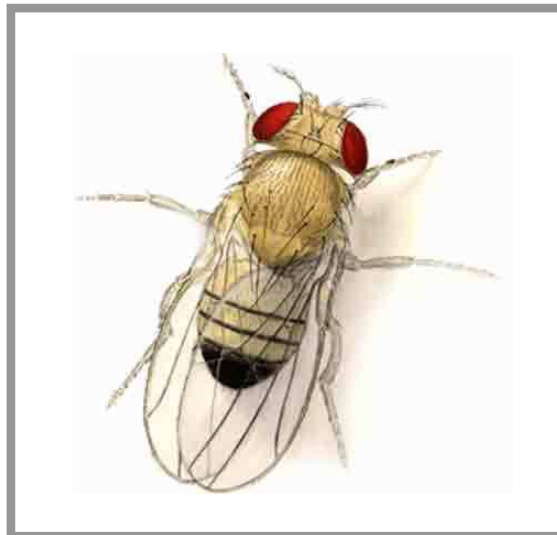


Figura 5. Macho de *D. melanogaster*.

<<http://www.life.uiuc.edu/hing/research/flyfig-1.html>> Acessado em 04 de julho de 2008.

O extenso conhecimento genético da *D. melanogaster*, e a grande experiência obtida com este organismo ao longo dos anos, têm feito com que o mesmo seja considerado um organismo teste de excelência na elucidação da regulação de genes relacionados a doenças humanas (BIER; BODMER, 2004); no estudo da morte celular programada (CASHIO *et al.*, 2005); assim como na área da Genética Toxicológica (SARIKAYA; ÇAKIR, 2005; ÇAKIR; SARIKAYA, 2005).

As vantagens da utilização da *D. melanogaster* na Genética Toxicológica são principalmente devidas ao fato de a mesma ser um organismo eucarioto com ciclo de vida curto (aproximadamente 10 - 12 dias a 25°C) (**Figura 6**); possuir características morfológicas geneticamente muito bem determinadas; apresentar linhagens mutantes muito bem caracterizadas geneticamente; ser de fácil manutenção em laboratório; devido ao pequeno tamanho do corpo, permitir a procriação de um grande número de indivíduos em espaços reduzidos; a manutenção dos estoques ser de baixo custo; possuir sistema versátil para o metabolismo de agentes xenobióticos (sistema CYP450), capaz de ativar promutágenos e procarcinógenos (GRAF; VAN SCHAIK, 1992; GRAF *et al.*, 1996).

Durante os últimos 30 anos tem sido comum a utilização de testes de curta duração para a identificação de agentes genotóxicos e antigenotóxicos (SUNDERMAN-MERSCH *et al.*, 2004). Devido ao curto tempo de geração, a *D. melanogaster* tem sido amplamente utilizada na avaliação de agentes genotóxicos e antigenotóxicos por meio dos seguintes sistemas testes: 1) Teste para avaliação de indução de tumores epiteliais em linhagens heterozigotas para o gene supressor de tumor *wts* (EEKEN *et al.*, 2002); 2) Teste para avaliação de danos cromossômicos em células germinativas, por meio do teste da perda do cromossomo X em anel (ring-X loss) (SOUSA *et al.*, 2003); 3) Teste para detectar danos no DNA e reparo, em células individualizadas em gel de eletroforese (Teste do cometa, "Comet Assay" ou "single cell gel electrophoresis technique") (SIDDIQUE *et al.*, 2005); 4) Teste para detecção de mutações recessivas letais ligadas ao cromossomo X (MIADOKOVA *et al.*, 2006); 5) Teste para detecção de mutação e recombinação somática em células de asas e olhos (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) (ISAENKO *et al.*, 2002; COSTA;

NEPOMUCENO, 2006; FRAGIORGE *et al.*, 2007; 2008; PANTALEÃO *et al.*, 2007; VALADARES *et al.*, 2008).

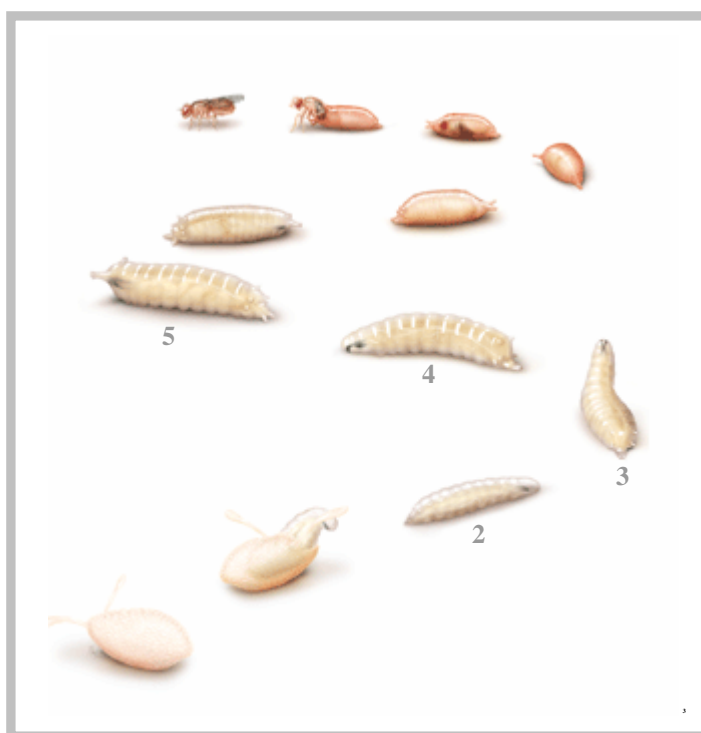


Figura 6. Ciclo de vida da *D. melanogaster*, mostrando as diferentes etapas do desenvolvimento: 1 - ovo; 2 – larva de 1º estágio (24h após a ovoposição); 3 - larva de 2º estágio (48h após a ovoposição); 4 - larva de 3º estágio (72h após a ovoposição); 5 – pupa (~120 h); 6 – imago ou adulto (10 a 12 dias após a ovoposição) (Capa da Revista Science, v. 297, 2002 < <http://www.sciencemag.org/content/vol297/issue5590/cover.dtl>> acesso em 04 de julho de 2008).

1.6 O teste para detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) em células de asas de *D. melanogaster*.

O teste para detecção de mutação e recombinação somática em células de asas de *D. melanogaster* (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART), desenvolvido por Graf *et al.* (1984), é um teste de curta duração, sensível e barato, que utiliza apenas equipamentos básicos de laboratório, tais como microscópio estereoscópico, para montagem de asas em lâminas de microscopia, e microscópio óptico de luz, com aumento de 400X, necessário para a visualização dos pêlos das asas (**Figura 7**). Além de apresentar resultados altamente confiáveis e reproduzíveis, permite quantificar a atividade recombinogênica, contra a atividade mutagênica, de diferentes compostos e misturas (SPANÓ *et al.*, 2001).

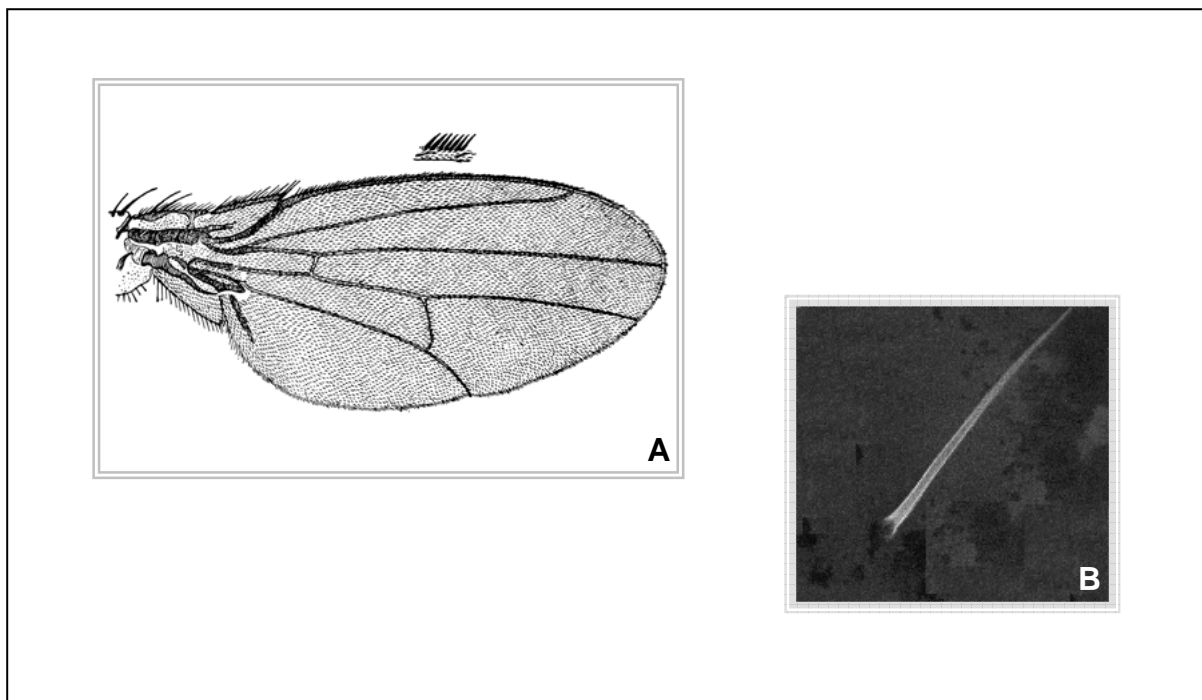


Figura 7. (A) Esquema representativo da asa de *D. melanogaster*. (B) Fotomicrografia de pêlo simples (microscopia eletrônica) (cortesia do Dr. Ulrich Graf, Institute of Technology ETH and University of Zürich, Swerzenbach, Suíça).

O SMART foi desenvolvido visando observar alterações induzidas nos discos imaginiais das asas de larvas (GRAF *et al.*, 1984; GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995), levando à indução de manchas mutantes (clones) que surgem a partir da perda da heterozigose em células heterozigotas para genes recessivos marcadores.

Para a realização do teste são utilizadas três linhagens mutantes de *D. melanogaster*: 1) Linhagem “flare-3” (*flr3*), que possui um gene mutante marcador recessivo em hemizigose (*flr3*) no cromossomo nº 3 (3-38,8), que afeta o aspecto fenotípico dos pêlos das células da asa (base alargada); 2) Linhagem “multiple wing hairs” (*mwh*), que possui um gene mutante marcador (*mwh*) no cromossomo nº 3 (3-0,3) que, em homozigose recessiva, determina que as células das asas apresentem três ou mais pêlos, no lugar de um; e Linhagem “ORR; flare-3” (*ORR; flr3*), que possui um gene marcador recessivo em hemizigose (*flr3*) no cromossomo nº 3 (3-38,8), que além de afetar os pêlos das células da asa, como na linhagem “flare-3”, possui um cromossomo nº 2, transferido de uma linhagem selvagem Oregon R (ORR), resistente ao DDT (DAPKUS; MERREL, 1977), que é caracterizada por um aumento na atividade de enzimas citocromo P450. A ativação de promutágenos, e de procarcinógenos, é realizada pelas enzimas citocromo P450, que consiste de várias formas de isoenzimas que têm a capacidade de metabolizar uma grande variedade de substratos.

O gene *flr3* das linhagens “flare-3” e “ORR; flare-3” é letal em homozigose. Assim sendo, ambas as linhagens possuem o gene *flr3* em hemizigose, sendo que o cromossomo homólogo, balanceador (*TM3, Bd^s*), apresenta inversões múltiplas (GRAF *et al.*, 1984).

O teste para detecção de manchas mutantes nas asas de *D. melanogaster* é realizado por meio de dois cruzamentos: 1] Cruzamento padrão (ST - Standard Cross): Fêmeas virgens da linhagem “flare-3” são cruzadas com machos “multiple wing hairs” (Graf *et al.*, 1989); 2] Cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB - High Bioactivation Cross): Fêmeas virgens da linhagem “ORR-flare-3” são cruzadas com machos “multiple wing hairs” (GRAF; VAN SCHAİK, 1992; GUSMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995). A **Figura 8** apresenta esquema representativo dos cruzamentos ST e HB.

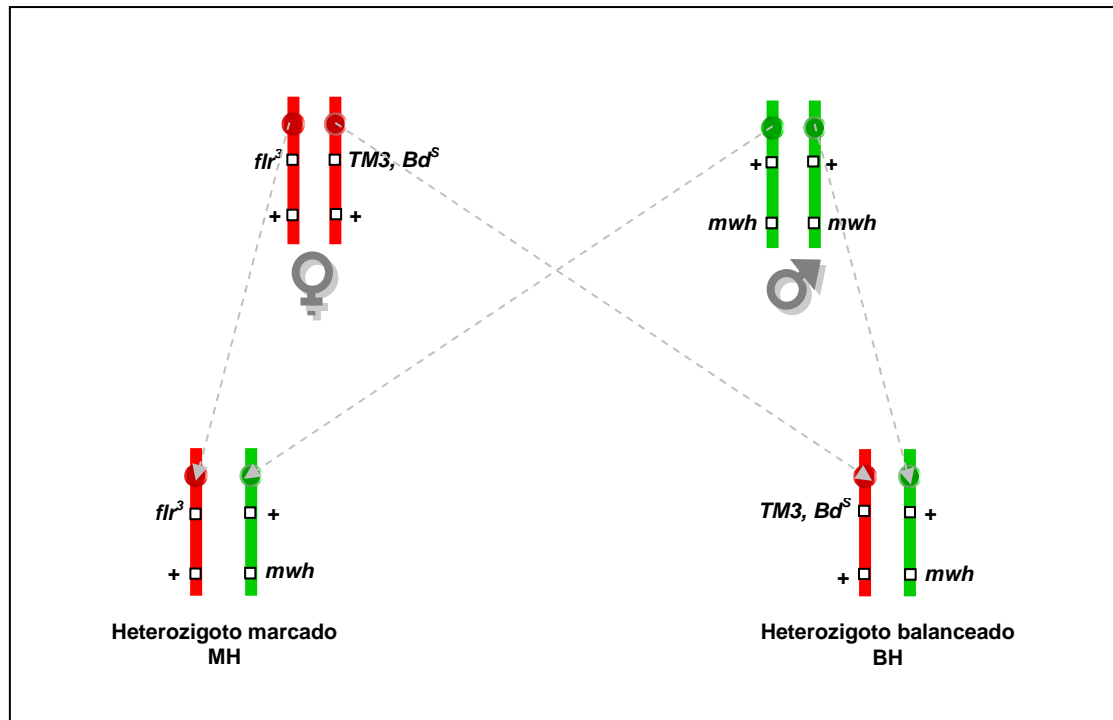


Figura 8. Esquema representativo dos cruzamentos ST e HB.

Desses cruzamentos são obtidos dois tipos de descendentes: trans-heterozigoto marcado (MH) ($mwh +/+ flr^3$), caracterizado por apresentar asas com bordas normais e pêlos normais; e heterozigoto balanceado (BH) ($mwh +/+ TM3, Bd^S$) caracterizado por apresentar asas com bordas serrilhadas e pêlos normais (GRAF *et al.*, 1984) (**Figura 9**).

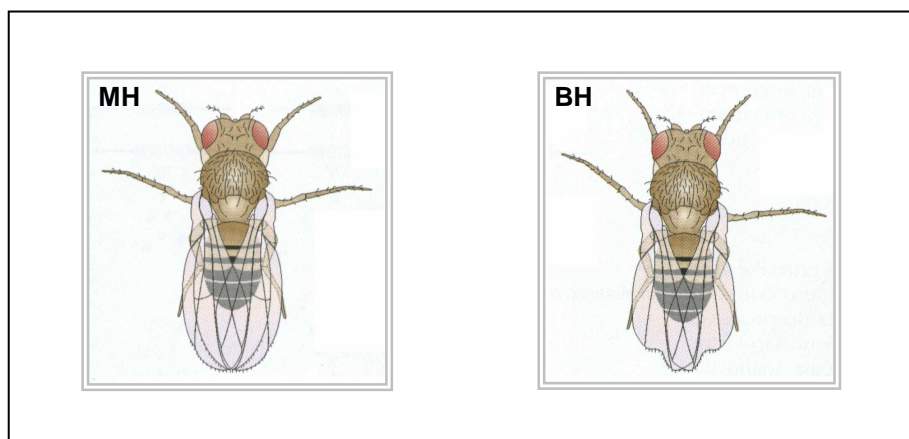


Figura 9. Esquema representativo de descendente MH, que apresenta asas com bordas normais; e de descendente BH, caracterizado por apresentar asas com bordas serrilhadas.

As larvas, de ambos genótipos, são tratadas com diferentes concentrações do agente químico a ser testado, de acordo com diferentes protocolos de tratamento (**Figura 10**).

Nos adultos emergentes MH as manchas mutantes aparecem como manchas simples, apresentando o fenótipo “*mwh*” ou “flare” ou manchas gêmeas (“*mwh*” e “flare” adjacentes) (**Figura 11**). Essas manchas mutantes podem ser induzidas por diferentes mecanismos genéticos, tais como mutação, aberração cromossômica ou recombinação somática (GRAF *et al.*, 1984).

Nos adultos emergentes BH as manchas mutantes aparecem apenas como manchas simples do tipo “*mwh*”, devido à presença do cromossomo balanceador, que apresenta inversões múltiplas, o que faz com que todos os eventos recombinacionais sejam inviabilizados. Assim, a frequência de manchas é consideravelmente reduzida. Nos descendentes BH apenas os eventos mutacionais levam à formação de manchas mutantes (GRAF *et al.*, 1984).

Durante a análise é registrado o número de manchas, assim como o tipo e o número de pêlos mutantes existentes em cada mancha.

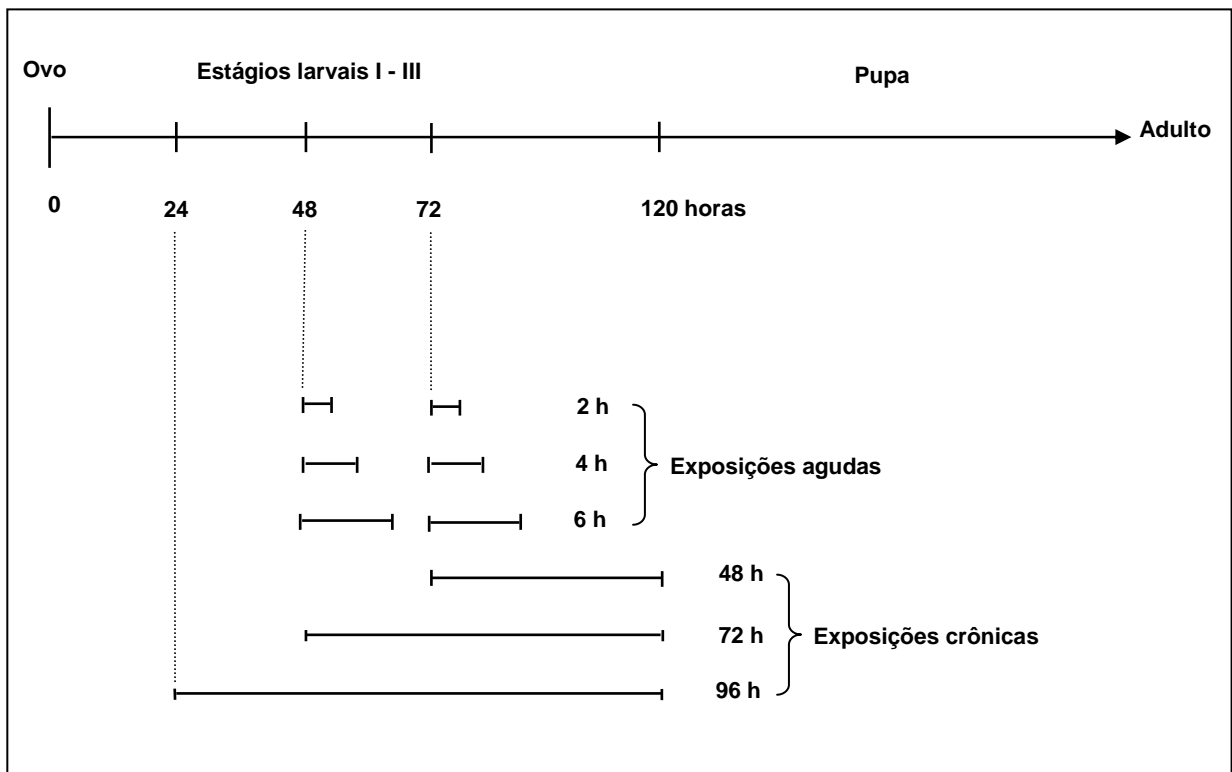


Figura 10. Diferentes protocolos de tratamento, levando a exposições crônicas e agudas, assim como a tratamentos combinados com ambos os tipos de exposição (Adaptado de Graf *et al.*, 1984).

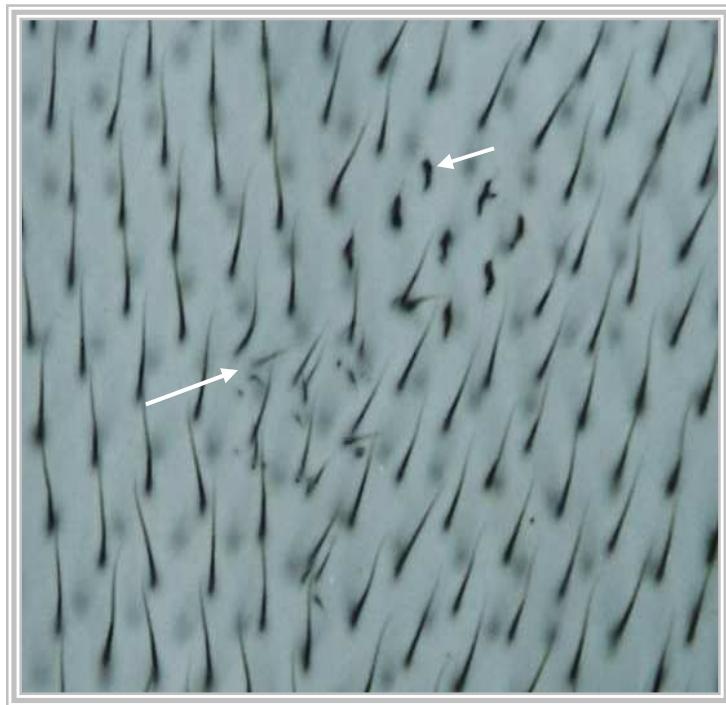


Figura 11. Fotomicrografia de asa de *D. melanogaster* obtida em microscópio óptico de luz (aumento de 400X), mostrando mancha gêmea (pêlos “flare” e “multiple wing hairs” adjacentes, na qual os pêlos “flare” estão indicados pela seta menor e os pêlos “multiple wing hairs” estão indicados pela seta maior.

2. Objetivos

Tendo em vista o crescente emprego do *P. ginseng* como suplemento herbáceo na medicina popular este trabalho teve como objetivos:

1. Verificar se uma forma solúvel em água, de raízes secas de *P. ginseng*, possui efeitos genotóxicos (mutagênicos, clastogênicos e/ou recombinogênicos), por meio do SMART, em célula de asas de *D. melanogaster*.
2. Verificar se esta forma solúvel em água de raízes secas de *P. ginseng* possui componentes com ação genotóxica direta (por meio do cruzamento ST) ou ação genotóxica indireta (por meio do cruzamento HB).
3. Uma vez determinado que a forma solúvel em água de raízes secas de *P. ginseng* não possui efeitos genotóxicos, verificar se a mesma possui efeitos protetores contra ação genotóxica da DOX.
4. Quantificar a frequência de recombinação induzida pela DOX.
5. Verificar se esta forma solúvel em água de raízes secas de *P. ginseng* possui efeitos protetores de ação direta ou indireta contra ação genotóxica da DOX.
6. Avaliar se a forma solúvel em água de raízes secas de *P. ginseng* possui efeitos antimutagênicos e/ou antirecombinogênicos.

3. Referências Bibliográficas

- ALEXANDRE RF, BAGATINI F, SIMÕES CMO. 2008. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos à base de ginkgo ou ginseng. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18:117-126.
- ALI MB, HANH EJ, PAEK KY. 2005a. CO₂-induced total phenolics in suspension cultures of *Panax ginseng* C. A. Meyer roots: role of antioxidants and enzymes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43:449-457.
- ALI MB, THANH NT, YU KW, HAHN EJ, PAEK KY, LEE HL. 2005b. Induction in the antioxidative systems and lipid peroxidation in suspension culture roots of *Panax ginseng* induced by oxygen bioreactors. *Plant Science*, 169:833-841.
- ALVES HM. 2001. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. *Química Nova*, 3:10-15.
- ANDRADE HHR, SANTOS JH, GIMMLER-LUZ MC, CORREIA MJF, LEHMANN M, REGULY ML. 1992. Suppressing effects of vanillin on chromosome aberrations that occur spontaneously or are induced by mitomycin-c in the cell line of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 279: 281 – 287.
- BAARS AJ. 1980. Biotransformation of xenobiotics in *Drosophila melanogaster* and its relevance for mutagenicity testing. *Drug Metabolism Reviews* 11: 191-221.
- BALU M, SANGEETHA P, MURALI G, PANNEERSELVAM C. 2005. Age-related oxidative protein damages in central nervous system of rats: modulatory role of grape seed extract. *International Journal of Developmental Neuroscience* 23: 501–507.
- BATISTATOU A. 2004. Mitoses and Cancer. *Medical Hypotheses* 63: 281-282.

- ÇAKIR S, SARIKAYA R. 2005. Genotoxicity testing of some organophosphate insecticides in the *Drosophila* wing spot test. *Food and Chemical Toxicology* 45: 443-450.
- CASHIO P, LEE TV, BERGMAN A. 2005. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila melanogaster*. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16: 225-235.
- CHEN K, SUH J, CARR A C, MORROW JD, ZEIND J, FREI B. 2000. Vitamin C suppresses oxidative lipid damage *in vivo*, even in the presence of iron overload. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 279: E1406–E1412.
- CHO EJ, PIAO XL, JANG MH, BAEK SH, KIM HY, KANG KS, WON KWON SW, PARK JH. 2008. The effect of steaming on the free amino acid contents and antioxidant activity of *Panax ginseng*. *Food Chemistry* 107: 876–882.
- CHO WCS, CHUNG WS, LEE SKW, ALBERT WN, LEUNG AWN, CHRISTYOPHER HK, CHENG C, KEVIN KM. 2006. Ginsenoside Re of *Panax ginseng* possesses significant antioxidant and antihyperlipidemic efficacies in streptozotocin-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology* 550:173-179.
- COSTA WF, NEPOMUCENO JC. 2006. Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and minerals on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47:18-24.
- DASGUPTA T, BANERJEE S, YADAVA PK, RAO AR. 2004. Chemopreventive potential of *azadirachta indica* (Neem) leaf extract in murine carcinogenesis model systems. *Journal of Ethnopharmacology* 92: 23-36.
- DE FLORA S, RAMEL C. 1988. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis - classification and overview. *Mutation Research* 202: 285 – 306.

- DEMIR E, KOCAOGLU S, KAYA B. 2008. Genotoxicity testing of four benzyl derivatives in the *Drosophila* wing spot test. *Food and Chemical Toxicology* 46: 1034–1041.
- DI MAMBRO VM, FONSECA MJV. 2005. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37: 287-295.
- DRODGE W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82: 47-95.
- EEKEN JCJ, KLINK I, VAN VEEN BL, PASTINK A, FERRO W. 2002. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene *wts*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 40:277-282.
- FRAGIORGE EJ. 2000. Efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado ao cloridrato de doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, tratadas na presença e ausência de luz. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, 87pp.
- FRAGIORGE EJ, REZENDE AAA, GRAF U, SPANÓ MA. 2008. Comparative genotoxicity evaluation of imidazolinone herbicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology* 46: 393-401.
- FRAGIORGE EJ, SPANÓ MA, ANTUNES LMG 2007. Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics and Molecular Biology* 30: 449-455.
- FREI H, CLEMENTS J, HOWE D, WÜRGLER FE. 1992. The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 279: 21-33.
- GEBHART E. 1992. Anticlastogenicity in cultured mammalian cells. *Mutation Research* 267: 211-220.

- GRAF U, SPANÓ MA, RINCÓN JG, ABRAHAM SK, ANDRADE HH. 1996. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. African Newsletter on Occupational Health and Safety 6 (Suppl 1): 9 -13.
- GRAF U, van SCHAIK N. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Mutation Research 271: 59-67.
- GRAF U, WÜRGLER FE, KATZ AJ, FREI H, JUON H, HALL CB, KALE PG. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environmental Mutagenesis 6: 153-188.
- GRAF U. 1995. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagens treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Experientia 51: 168-173.
- GUZMÁN-RINCÓN J, GRAF U, 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Buttter FM *et al* (eds). Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental changes. Plenum Press, New York, p: 169-181.
- HALLIWELL B. 2000. The antioxidant paradox. Lancet 355: 1179-1180.
- HALLIWELL B, ARUOMA OI. 1991. DNA damage by oxygen-derived species: Its mechanism and measurement in mammalian systems. Febs Letters 281: 9-19.
- IMAI K, SUGA K, NAKACHIN K. 1997. Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population. Preventive Medicine 26: 769-775.
- ISAENKO OA, KARR TL, FEDER ME. 2002. Hsp70 and thermal pretreatment mitigate developmental damage caused by mitotic poisons in *Drosophila*. Cell Stress & Chaperones 7:297-308.

- JEONG C-S, CHAKRABARTY D, HAHN E-J, LEE H-L, PAEK K-Y. 2006. Effects of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth and bioactive compound production in bioreactor culture of ginseng adventitious roots. *Biochemical Engineering Journal* 27: 252–263.
- JI BT, CHOW WH, HSING AW, Mac LAUGHLIN JK, DAI Q, GAO YT, BLOT WJ, FRAUMENI JRJF. 1999. Green tea consumption and risk of pancreatic and colorectal cancers. *International Journal of Cancer* 70: 255-258.
- JI LL. 1995. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radical Biology and Medicine* 18: 1079-1086.
- JIANG H, HUTCHINSON CR. 2006. Feedback regulation of doxorubicin biosynthesis in *Streptomyces peucetius*. *Research in Microbiology* 157:666-674.
- JIN J, SHAHI S, KANG HK, VAN VEEN HW, FAN TP. 2006. Metabolites of Ginsenosides as novel BCRP Inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 345: 1308-1314.
- JIN SH, NAM KY, HYUN HC, KYANG JS, PARK JK, 1994. Effect of red ginseng saponins on learning behavior of rats in the water maze. *Korean Journal of Ginseng Science*. 18: 39-43.
- JIN SH, PARK JK, NAM KY, PARK SN, JUNG NP. 1999. Korean red ginseng saponins with low ratios of protopanaxadiol and protopanaxatriol saponins improve scopolamine-induced learning disability and spatial working memory in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 66: 123-129.
- JUNG CH, SEOG HM, CHOI IW, CHOI HD, CHO HY. 2006. Effects of wild ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) leaves on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 98: 245-250.

- KALENDER Y, YEL M, KALENDER S. 2005. Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats. The effects of vitamin E and catechin. *Toxicology* 209: 39-45.
- KALIORA AC, DEDOUSSIS GVZ, SCHIMIDT H. 2006. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* 187: 1–17.
- KAYA B, MARCOS R, YANIKOGLU A, CREUS A. 2004. Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* using two different strains. *Mutation Research* 557: 53 - 62.
- KELLY P. 2008. The cancer critical care paradox. *Current Anaesthesia & Critical Care* 19: 96-104.
- KIEFER D, PANTUSO T. 2002. *Panax ginseng*. *American Family Physician* 68: 1539-1542.
- KIM SY, JE JY, KIM SK. 2007. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *Journal Nutritional Biochemistry* 18: 31-38.
- KIM SH, PARK KS. 2003. Effects of *Panax ginseng* extract on lipid metabolism in humans. *Pharmacological Research* 48: 511-513.
- KUO YH, IKEGAMI F, LAMEIN F. 2003. Neuroactive and other free amino acids in seed and young plants of *Panax ginseng*. *Phytochemistry* 62: 1087-1091.
- LEE BH, LEE SJ, HUI JH, LEE S, SUNG JH, HUH JD, MOON CK. 1998. *In vitro* antigenotoxic activity of novel ginseng saponin metabolites, *Planta Medica* 64: 500-503.
- LEE SH, JUNG BH, KIM SY, LEE EH, CHUNG BC. 2006. The antistress effect of ginseng total saponin and ginsenoside Rg3 and Rb1 evaluated by brain polyamine level under immobilization stress. *Pharmacological Research* 54: 46-49.

- LEHMAN M, FRANCO A, VILAR KSP, REGULY ML, ANDRADE HHR. 2003. Doxorubicin and two of its analogous are preferential inducers of homologous recombination compared with mutation events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 539: 167-175.
- LI Y, JIANG B, ZHANG T, MU W, LIU J. 2008. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry* 106: 444–450.
- LIU ZQ, LUO XY, LIU GZ, CHEN YP, WANG ZC, SUN YX. 2003. *In vitro* study of the relationship between the structure of ginsenoside and its antioxidante or prooxidative activity in free radical induced hemolysis of human erythrocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2555-2558.
- LYKKESFELDT J, SVENDSEN O. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Veterinary Journal* 173: 502-511.
- MERSCH-SUNDERMANN V, SIEGFRIED K, XIN-JIANG WU, DARROUDI F, KASSIE F. 2004. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology* 198: 329-340.
- MIADOKOVA E, NADOVA S, TREBATICKA M, GROLMUS J, KOPASKOVA M, RAUKO P, MUCAJI P, GRANCAI D. 2006. Research on biomodulatory effect of natural compounds. *Neuroendocrinology Letters* 27:53-56.
- MOHAN IK, KUMAR KV, NAIDU MUR, KHAN M, SUNDARAM C. 2006. Protective effect of cardipro againts doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Phytomedicine*. 13: 222-229.
- NAKACHI K, SUEMASU K, SUGA K, TAKEO T, IMAI K, HIGASHI Y. 1998. Influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among japanese patients. *Japanese journal of cancer research* 89: 245-261.

- OLIVEIRA ACC, PEREZ AC, PRIETO JG, DUARTE IDG, ALVAREZ AI. 2005. Protection of *Panax ginseng* in injured muscles alter eccentric exercise. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 211-214.
- PANTALEÃO SM, ALCANTARA AV, ALVES JPH, PAVANIN LA, GRAF U, REZENDE AAA, VALADARES BLB, FRAGIORGE EJ, SOUSA NC, GUTERRES ZR, SPANÓ MA. 2007. Assessing the impact of pollution on the Japaratuba River in Brazil using the *Drosophila* wing spot test. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 48: 96-105.
- PARK JK, NAM KY, HYUN HC, JIN SH, CHEPURNOV SA, CHERPUNOVA NE. 1994. Effects of red ginseng triol saponin fractions on the spatial memory functions studied with 12 arm radial maze. *Korean Journal of Ginseng Science*. 18: 32-38.
- PARK OJ, SURH YJ. 2004. Chemopreventive potential of epigallocatechin gallate and genistein: evidence from epidemiological and laboratory studies. *Toxicology Letters*. 150: 43-56.
- PEIXOTO ABF. 1982. Flora do Estado de Goiás: Coleção Rizzo. Goiânia, Ed. da Universidade Federal de Goiás, v. 3, p: 45 ilustr.
- PERSSON IAL, DONG L, PERSSON K. 2006. Effect of *Panax ginseng* extract (G115) on angiotensin – converting enzyme (ACE) activity and nitric oxide (NO) production. *Journal of Ethnopharmacology* 105: 321-325.
- PICADA JN, KERN AL, RAMOS LLP, SAFFI J. 2003. O estresse oxidativo e as defesas antioxidantes. In: SILVA J, ERDTMANN B, HENRIQUES JAP. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance,. p. 251-264.
- POOL-ZOBEL B, VEERIAH S, BÖHMER FD. 2005. Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens-focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. *Mutation Research* 591: 79-92.

- POULSEN HE. 2005. Oxidative DNA modifications. *Experimental and Toxicologic Pathology* 57: 161–169.
- RADAD K, GILLE G, MOLDZIO R, SAITO H, RAUSCH WD. 2004. Ginsenosides Rb₁ and Rg₁ effects on mesencephalic dopaminergic cells stressed with glutamate. *Brain Research* 1021: 41-53.
- RHEE YH, AHN JH, CHOE J, KANG, KW, JOE C. 1990. Inhibition of mutagenesis and transformation by root extracts of *Panax ginseng in vitro*. *Planta Medica* 57: 125-128.
- RIBEIRO LR, MARQUES EK. 2003. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: *Mutagênese Ambiental*. Ed. Ribeiro LR, Salvadori DMF e Marques EK. Editora da ULBRA, pp355.
- SARIKAYA R, ÇAKIR S. 2005. Genotoxicity testing of four food preservatives and their combinations in the *Drosophila* wing spot test. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20: 424-430.
- SIDDIQUE HR, CHOWDHURI DK, SAXENA DK, DHAWAN A. 2005. Validation of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for genotoxicity assessment using modified alkaline comet assay. *Mutagenesis* 20:285-290.
- SOUSA NC, CARVALHO S, SPANÓ MA, GRAF U. 2003. Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 41:293-299.
- SPORN MB, DUNLOP NM, NEWTON DL, SMITH JM. 1976. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin a and its synthetic analogs (retinoids). *Federation. Proceedings* 35: 1332-1338.
- SUN HX, YE YP, PAN HJ, PAN YJ, 2004. Adjuvant effect of *Panax Notoginseng* saponins on the immune responses to ovalbumin in mice. *VACCINE*. 22: 3882-3889.

- TANG W, EISENBRAND G. 1992. *Panax ginseng* C. A. Meyer. Chinese drug of plant origin. Berlin: Springer. 710 – 737.
- TREVISAN MG, POPPI RJ. 2003. Determination of doxorubicin in human plasma by excitation-emission matrix fluorescence and multi-way analysis. *Analytica Chimica Acta*. 493: 69-81.
- VALADARES BLB, GRAF U, SPANÓ MA. 2008. Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology* 46: 1103–1110.
- WIKIPÉDIA. 2008. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Drosophila_melanogaster> acessado em 04 de julho de 2008.
- YAGMURCA M, ERDOGAN H, IRAZ M, SONGUR A, UCAR M, FADILIOGLU E. 2004. Caffeic acid phenolic ester as a protective agent against doxorubicin nephrotoxicity in rats. *Clinica Chimica Acta* 348: 27-34.
- YU KW, MURTHY HN, JEONG CS, HAHN EJ. 2005. Organic germanium stimulates the growth of ginseng adventitious roots and ginsenoside production. *Process Biochemistry*. 40: 2959-2961.
- YU BP. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews* 74: 139-162.
- ZHANG B, LI XP, NAKAMA H, ZHANG X, WEI N, ZHANG X, XHANG L. 2002. A case-control study on risk of changing food consumption for colorectal cancer. *Cancer Investigation* 20: 458-463.
- ZHANG QH, WU CF, DUAN L, YANG JY. 2008. Protective effects of total saponins from stem and leaf of *Panax ginseng* against cyclophosphamide-induced genotoxicity and apoptosis in mouse bone marrow cells and peripheral lymphocyte cells. *Food and Chemical Toxicology* 46: 293-302.
- ZHOU SY, PALMEIRA CM, WALLACE KB. 2001. Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes. *Toxicology Letters* 121: 151-157.

Capítulo 2

**Protection by *Panax ginseng* C.A. Meyer against the genotoxicity of
doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster***

(Genetics and Molecular Biology - MS 2007/281)

Protection by *Panax ginseng* C.A. Meyer against the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*

Denise G. Pereira¹, Lusânia M. G. Antunes², Ulrich Graf³ and Mário A. Spanó¹

¹*Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brazil*

²*Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil*

³*Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Sciences, ETH Zurich, CH-8603 Schwerzenbach, Switzerland*

Running title: Antigenotoxic effects of *Panax ginseng*

Key words: Antigenotoxicity; SMART; wing spot test.

Send correspondence to Mário Antônio Spanó. Laboratório de Mutagênese, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Bloco D – Sala 2D52, Campus Umuarama, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil. E-mail: maspano@ufu.br

ABSTRACT

Panax ginseng is one of the most widely prescribed herbal medicines for the treatment of cancer, diabetes, chronic inflammation, and neurodegenerative and cardiovascular diseases. Since the use of alternative medicines in combination with conventional therapy may increase the risk of unwanted interactions, we investigated the possible genotoxicity of a water-soluble form of the dry root of *P. ginseng* (2.5, 5.0 or 10.0 mg/mL) and its ability to protect against the genotoxicity of doxorubicin (DOX; 0.125 mg/mL) by using the *Drosophila melanogaster* wing somatic mutation and recombination test (SMART) with standard and high-bioactivation crosses of flies. *Panax ginseng* was not genotoxic at the concentrations tested, whereas DOX-induced genotoxicity in marker-heterozygous flies resulted mainly from mitotic recombination. At low concentrations, *P. ginseng* had antirecombinogenic activity that was independent of the concentration of extract used. Recombination events may promote cancer, but little is known about the ability of *P. ginseng* to inhibit such recombination or modulate DNA repair mechanisms.

INTRODUCTION

Plant products are being increasingly used as complementary or alternative medicines for the treatment for a variety of diseases, including cancer (Meijerman *et al.*, 2006), although in many cases there is still only limited scientific evidence for their therapeutic efficacy. The root of *Panax ginseng* C. A. Meyer (Araliaceae), a common plant in eastern Asia, is widely used in Chinese natural medicine (Lee *et al.*, 2004; Yoshikawa *et al.*, 2007). *Panax ginseng* is also being increasingly prescribed in Korea, Japan and Western countries for the treatment of cancer, diabetes, chronic inflammation, and neurodegenerative and cardiovascular diseases (Yun, 1996; Radad *et al.*, 2006). Several studies have demonstrated the therapeutic potential of ginseng in the central nervous system through its ability to improve longevity (Attele *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000) and cognitive performance (Kennedy *et al.*, 2004; Reay *et al.*, 2005), as well as its adaptogenic properties in contributing to the equilibrium of the human body under prolonged stress (Kumar *et al.*, 1996).

Ginseng contains many physiologically important constituents that include saponins, oils and phytosterol, carbohydrates and sugars, organic acids, nitrogenous substances, amino acids and peptides, vitamins and minerals (iron, copper, zinc), and several enzymes (Hou, 1977; Attele *et al.*, 1999). Of the various compounds isolated from ginseng roots, the ginsenosides are known to have multiple pharmacological activities (Deng and Zhang, 1991; Baek *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). At the doses commonly used, the dried roots and rhizomes of ginseng are not toxic to rats, dogs and humans (Radad *et al.*, 2006).

There is increasing interest in the identification of herbal and dietary compounds that can prevent or reduce the risks of cancer or serve as therapeutic

agents (Rauscher *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2000). One result of these efforts is that chemoprevention has emerged as a cost-effective means of preventing mutagenesis and carcinogenesis, and as a promising approach for minimizing the adverse effects of human exposure to environmental carcinogens (Pool-Zobel *et al.*, 1997; Rauscher *et al.*, 1998).

Doxorubicin (DOX), a broad-spectrum anthracycline antibiotic, is genotoxic and carcinogenic but is still widely used as an antitumor agent for the treatment of cancer (Minotti *et al.*, 2004). The potential usefulness of this drug is limited by the development of adverse effects such as cardiotoxicity and nephrotoxicity. DOX may also be involved in secondary malignancies. The main mechanisms of action proposed for DOX include the inhibition of topoisomerase II, DNA intercalation, free radical formation, reductive bioactivation of the quinone ring to a semiquinone radical, DNA alkylation and cross-linking (Gewirtz, 1999; Ramji *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2006). These mechanisms can result in the cleavage of DNA which, if not repaired, may lead to mutations and chromosomal aberrations in tumors as well as in healthy cells (Antunes and Takahashi, 1998; Gentile *et al.*, 1998; Islaih *et al.*, 2005; Antunes *et al.*, 2007; Costa and Nepomuceno, 2006; Fragiorge *et al.*, 2007; Valadares *et al.*, 2008).

We have used the *Drosophila melanogaster* (fruit fly) wing somatic mutation and recombination test (SMART) as a biological indicator of chemical genotoxicity or antigenotoxicity. This one-generation test, which is very efficient and sensitive, is based on the ability of fruit flies to metabolize certain procarcinogens to their reactive metabolites and has been used to study the genotoxicity and antigenotoxicity of various natural compounds (Idaomar *et al.*, 2002; Laohavechvanich *et al.*, 2006;

Silva *et al.*, 2006; Fragiorge *et al.*, 2007; Mezzoug *et al.*, 2007; Tellez *et al.*, 2007; Valadares *et al.*, 2008). The wing SMART is based on the principle that a loss of heterozygosity leads to the expression of recessive marker genes in larval imaginal disk cells, thereby yielding clones of mutant cells that can be identified as mosaic spots on the wings (Graf *et al.*, 1984, 1998). These spots can be produced by mitotic recombination or mutations (deletions, point mutations, specific types of translocation, etc.). The analysis of two genotypes (one with structurally normal chromosomes and another with a multiply inverted balancer chromosome) allows the quantitative determination of the recombinogenic activity of genotoxic compounds (Graf *et al.*, 1998; Spanó *et al.*, 2001).

The identification of additional and more effective antigenotoxic compounds may contribute to the development of dietary supplements that could be useful in chemotherapy. Because the use of alternative medicines in combination with conventional therapy may increase the risk of unwanted interactions in cancer patients (Meijerman *et al.*, 2006), in this work we used the wing SMART to investigate the possible genotoxicity of three doses of a water-soluble form of the dry root of *P. ginseng* and its ability to protect against the genotoxicity of DOX. To our knowledge the effects of ginseng on DOX genotoxicity have not yet been studied *in vitro* or *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Chemical agents

The water-soluble form of the dry root of *P. ginseng* C. A. Meyer (ginseng coreano, in Portuguese) was obtained from Officinal Farmácia de Manipulação (Goiânia, GO, Brazil). Doxorubicin (DOX, Doxina[®] – Eurofarma Laboratórios Ltda., São Paulo, Brazil; CAS No. 23214-92-8) was obtained from Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia, MG, Brazil) and dissolved in ultrapure water in the dark. Ultrapure water, used as a negative control, was obtained from a MilliQ system (Millipore, Vimodrone, Milan, Italy). All solutions were freshly prepared in ultrapure water immediately before use.

Strains and crosses

For the wing SMART, three strains of *D. melanogaster* [(i) the *multiple wing hairs*: *y*; *mwh* *j*; (2) the *flare-3*: *flr³/In(3LR)TM3*, *ri p^osep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*; and (iii) the *ORR*; *flare-3*: *ORR*; *flr³/In(3LR)TM3*, *ri p^osep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*], and two crosses were used. The two crosses consisted of a standard (ST) cross in which *flare-3* females were mated with *mwh* males (Graf et al., 1989) and a high bioactivation (HB) cross in which *ORR*; *flare-3* females were mated with *mwh* males (Graf and van Schaik, 1992). The latter cross is highly sensitive to promutagens and procarcinogens because of the increased level of cytochrome P450 present in the *ORR*; *flare-3* strain. Both crosses produced experimental larval progeny that consisted of marker-heterozygous (MH) flies (*mwh* *+/+ flr3*) with phenotypically wild-type wings and balancer-heterozygous (BH) flies (*mwh* *+/+TM3*, *Bd^S*) with phenotypically serrate wings. Additional information about these strains and crosses

is provided elsewhere (Dapkus and Merrel, 1977; Hällström and Blanck, 1985; Graf et al., 1989; Graf and van Schaik, 1992; Saner et al., 1996).

Larval feeding

After an 8 h mating period, the eggs were collected from the two crosses and maintained in culture flasks containing an agar-agar base (3% w/v) and a layer of fermenting live baker's yeast supplemented with sucrose. Third instar larvae from these eggs were collected and transferred to glass vials containing 1.5 g of mashed potato flakes rehydrated with 5 ml of a solution containing the water soluble form of the dry roots of *P. ginseng* (2.5, 5.0 or 10.0 mg/mL) alone or in association with DOX (0.125 mg/mL). Negative (ultrapure water) and positive (DOX 0.125 mg/mL) controls were included in these experiments. The larvae were allowed to feed on the medium until completion of their larval life (~48 h). The experiments were done at 25°C and a relative humidity of 60-70%.

Analysis of adult flies

Adult flies were collected and stored in 70% ethanol. The wings of MH flies were mounted on slides in Faure's solution and examined for spots by using a compound microscope at 400X magnification. The wings of BH flies were mounted and analyzed whenever a positive response was obtained in the MH progeny. Single spots resulted from point mutations, chromosomal aberrations, or recombination events, whereas twin spots (*mwh* and *flr*³) were produced by mitotic recombination between the proximal marker *flr*³ and the centromere of chromosome 3. Only *mwh* single spots were observed in the wings of BH flies. The results obtained in MH and

BH flies were used to assess the recombinogenic potential of the water soluble form of the dry root of *P. ginseng* and DOX (Frei *et al.*, 1992; Graf *et al.*, 1992; Spanó *et al.*, 2001).

Data evaluation and statistical analysis

For statistical evaluation, the multiple-decision procedure of Frei and Würigler (1988) was used and allowed four diagnoses: +, positive; w+, weak positive; -, negative and i, inconclusive. The frequencies of each type of mutant clone per fly in a treated series were compared pair-wise (i.e., negative control vs. *Pg*; DOX alone vs. DOX plus *Pg*) using the conditional binomial test described by Kastenbaun and Bowman (1970). For the final statistical analysis of all positive outcomes, the non-parametric Mann-Whitney *U*-test with $\alpha = \beta = 0.05$ was used to exclude false positive results (Frei and Würigler, 1995). The frequencies of clone induction per 10^5 cells were used to determine the recombinogenic activity based on the following parameters: mutation frequency (F_M) = frequency of clones in BH flies/frequency of clones in MH flies, recombination frequency (F_R) = $1 - F_M$, frequency of the total number of spots (F_T) = total number of spots in MH flies (considering *mwh* and *flr*³ spots)/number of flies, frequency of mutation = $F_T \times F_M$ and frequency of recombination = $F_T \times F_R$ (Santos *et al.*, 1999; Sinigaglia *et al.*, 2006). Based on the control-corrected spot frequencies per 10^5 cells the percentage of inhibition by *P. ginseng* was calculated as (DOX alone – *P. ginseng* plus DOX/DOX alone) x 100 (Abraham, 1994).

RESULTS

Tables 1 and 2 show the wing SMART results for the chronic treatment of larvae with *P. ginseng* alone (2.5, 5.0 or 10.0 mg/mL) or in combination with DOX (0.125 mg/mL) using flies from ST and HB crosses, respectively. Larvae from both crosses were treated under identical conditions. Negative (ultrapure water) and positive (DOX 0.125 mg/mL) controls were included in each experiment. For statistical evaluation, the results from flies treated with *P. ginseng* were compared with data from the corresponding negative controls, whereas the results from flies treated with *P. ginseng* plus DOX were compared with data from the corresponding positive controls. Whenever there was a positive effect on the total number of spots in the MH progeny, the BH progeny were also analyzed.

There were no significant differences in the frequency of mutant spots between flies treated with 2.5, 5.0 or 10.0 mg of *P. ginseng*/mL and the negative control in ST cross MH flies (Table 1) and HB cross MH flies (Table 2). DOX (positive control) caused significant induction of all categories of spots in both the ST and HB crosses (Tables 1 and 2).

In ST cross MH flies, simultaneous treatment with 2.5 or 5.0 mg of *P. ginseng*/mL only weakly inhibited the increase in the total number of total spots caused by DOX whereas treatment with 10 mg of *P. ginseng*/mL did not alter the frequency of mutant spots (Table 1). In HB cross MH flies, simultaneous treatment with 2.5 or 10.0 mg of *P. ginseng*/mL reduced the total number of spots produced by DOX alone (Table 2). The frequency of mutant spots produced by DOX was not altered by simultaneous treatment with 2.5 or 5.0 mg of *P. ginseng*/mL in ST cross BH flies (Table 1), or 2.5 or 10.0 mg of *P. ginseng*/mL in HB cross BH flies (Table 2).

Thus, *P. ginseng* did not interfere with the frequencies of DOX-induced spots of mutational (genic and chromosomal) origin.

The frequencies of clone induction per 10^5 cells in MH and BH flies treated with DOX alone or with *P. ginseng* plus DOX were used to assess the mutagenic and recombinogenic potential of *P. ginseng*. The genotoxicity in MH flies was attributable mainly to mitotic recombination. The dry root of *P. ginseng* had antirecombinogenic activity that was not dose-dependent.

DISCUSSION

The wing SMART is rapid, sensitive and inexpensive assay for investigating the mutagenic and recombinogenic properties of chemicals, natural products and complex mixtures. This assay is also suitable for studying the mutagenic, antimutagenic and recombinogenic activities of drugs during multi-drug therapy (Graf *et al.*, 1984; Spanó *et al.*, 2001).

In this study, we examined the effects of three concentrations of *P. ginseng* (2.5, 5.0 or 10.0 mg/mL) in the wing SMART. *Panax ginseng* alone was not genotoxic in the ST and HB crosses. Simultaneous treatment with *P. ginseng* reduced the total number of spots produced by DOX in ST cross and HB cross MH flies, although the concentrations required for this varied between the crosses.

DOX was studied here because of its widespread use in cancer chemotherapy. A single concentration of DOX (0.125 mg/mL) was used in the wing SMART and significantly increased the number of mutant single spots and twin spots in ST and HB crosses. In addition to its mutagenic activity, DOX also has recombinogenic activity so that the frequency of twin spots reflected DOX-induced somatic recombination. These findings agree with other reports and show that DOX selectively induces homologous recombination when compared with mutational events in *D. melanogaster* somatic cells (Lehmann *et al.*, 2003; Costa and Nepomuceno, 2006; Fragiorge *et al.*, 2007; Valadares *et al.*, 2008).

The HB cross has constitutively high levels of cytochrome P450 and is characterized by a high sensitivity to promutagens and procarcinogens (Spanó *et al.*, 2001). Comparison of the results obtained with the ST and HB crosses showed that the elevated cytochrome P450 activity in HB flies influenced the genotoxicity of DOX

and that of the combined treatments, with a greater frequency of mutant spots in these flies, as also reported by Valadares *et al.* (2008). The greater genotoxicity of DOX in HB flies probably reflects the rapid one-electron reduction of this compound to its semiquinone free radical by cytochrome P450 (Goeptar *et al.*, 1993).

Many herbal and dietary products modulate cytochrome P450 activity. Gurley *et al.* (2002) used single-time point phenotypic metabolic ratios to determine whether long-term supplementation of St John's wort, garlic oil, *P. ginseng* and *Ginkgo biloba* affected CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1 and CYP3A4 activities in humans; no significant effect was observed for *P. ginseng*. In agreement with this, Gurley *et al.* (2005) observed that the concomitant ingestion of *P. ginseng* with prescription medications in elderly patients resulted in only slight inhibition (7%) of CYP2D6 activity.

Ginseng extract significantly decreases DNA synthesis and increases the rate of DNA excision repair synthesis in V79 Chinese hamster lung cells (Rhee *et al.*, 1991), in addition to its ability to attenuate inflammation-mediated carcinogenesis (Hofseth and Wargovich, 2007). These mechanisms can reduce tumor growth and improve the prognosis in cancer patients (Wang *et al.*, 2007). The beneficial effects of ginseng and its main constituents during chemotherapy are probably related to their ability to minimize the adverse effects of antineoplastic drugs. Recent findings *in vivo* and *in vitro* have shown that ginseng partially protects against DOX-induced testicular toxicity (Kang *et al.*, 2002), significantly attenuates the effects of DOX-induced heart failure in rats (You *et al.*, 2005), and reduces cisplatin-induced nephrotoxicity in cultured renal proximal tubular epithelial cells (Baek *et al.*, 2006). In

contrast, little is known about the effects of ginseng and its compounds when administered in combination with chemotherapeutic drugs.

Dietary supplementation of ginseng protects against oxidative damage *in vitro* and *in vivo*, from acute oxidative stress in cardiomyocytes to heart perfusion injury (Maffei-Facino *et al.*, 1999; Shao *et al.*, 2004). Yance and Sagar (2006) reported that *P. ginseng* has antiangiogenic activity and anticancer activities that are mediated by multiple interdependent processes, including changes in gene expression, signal processing and enzymatic activities. Although the mechanisms of action of the more than 60 ginsenosides isolated from *Panax* species remain poorly understood, studies of these compounds and their effects on tumor cells are of interest since several ginsenosides efficiently inhibit cell growth and the proliferation of human cancer cell lines (Wang *et al.*, 2007).

Total ginseng extracts or aqueous fractions of *P. ginseng* show antimutagenic effects that include a reduction in the frequency of radiation-induced DNA breaks in murine lymphocytes and protection against ¹³⁷Cs-induced micronuclei in human lymphocytes (Rhee *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2004). Ginseng-treated Swiss white mice show a significant reduction in the frequencies of chromosomal aberrations and micronuclei induced by benzo[a]pyrene (Panwar *et al.*, 2005). Ginsan, which itself is not mutagenic, decreases the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes induced by gamma radiation in bone marrow cells of C57BL/6 male mice (Ivanova *et al.*, 2006). Similarly, the ginsenoside Rh₂ enhances the antitumor activity and decreases the genotoxicity of cyclophosphamide in mice (Wang *et al.*, 2006). Ginseng has powerful antioxidant (Cho *et al.*, 2008) and antimutagenic (Geetha *et al.*, 2006; Ivanova *et al.*, 2006) properties, although the

mechanisms of these protective effects remain to be elucidated. Geetha *et al.* (2006) reported that ginseng extracts protected against H₂O₂-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* strain TA100, and against mutagenesis produced by 4-nitroquinoline-N-oxide in *S. typhimurium* strains TA98 and TA100 in the Ames test; however, the extract was unable to inhibit the damage induced by tert-butyl hydroperoxide in strain TA102 which is highly sensitive to reactive oxygen species. The authors concluded that the protection provided by the ginseng extract against 4-nitroquinoline-N-oxide and H₂O₂-induced mutagenicity in strains TA98 and TA100 was attributable mainly to the extract's ability to promote DNA repair rather than its antioxidant effects.

Our results indicate that *P. ginseng* is not genotoxic in somatic cells of *D. melanogaster*, and that at low concentrations it protects against the genotoxicity of DOX. Inhibitors of mutagenesis often act through multiple mechanisms or can interact with other inhibitors (De Flora and Ramel, 1988). The mechanisms by which *P. ginseng* protects cells against DOX-induced genotoxicity were not examined here but could involve direct interaction of the extract constituents with DOX, resulting in an antimutagenic effect, and/or an antioxidant action through radical scavenging or the activation of intracellular antioxidant enzymes. Although homologous recombination causes rearrangements of DNA that can promote cancer, little was known about the ability of *P. ginseng* to inhibit recombination or modulate DNA repair mechanisms. More data are required on the dose-response relationship of *P. ginseng* and the potential toxicities of combinations with chemotherapeutic drugs or radiation before this product can be recommended for cancer therapy.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and the Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

REFERENCES

- Abraham SK (1994) Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. *Mutagenesis* 9:383–386.
- Antunes LMG and Takahashi CS (1998) Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. *Mutat Res* 419:137-143.
- Antunes LMG, Bueno RBL, Dias FL and Bianchi MLP (2007) Acetylsalicylic acid exhibits anticlastogenic effects on cultured human lymphocytes exposed to doxorubicin. *Mutat Res* 626:155-161.
- Attele AS, Wu JA and Yuan CS (1999) Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. *Biochem Pharmacol* 58:1685-1693.
- Baek SH, Piao XL, Lee UJ, Kim HY and Park JH (2006) Reduction of cisplatin-induced nephrotoxicity by ginsenosides isolated from processed ginseng in cultured renal tubular cells. *Biol Pharm Bull* 29:2051-2055.
- Cho EJ, Piao XL, Jang MH, Baek SH, Kim HY, Kang KS, Kwon SW and Park JH (2008) The effect of steaming on the free amino acid contents and antioxidant activity of *Panax ginseng*. *Food Chem* 107:876-882.
- Costa WF and Nepomuceno JC (2006) Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and minerals on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 47:18-24.
- Dapkus D and Merrel DJ (1977) Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 87:685-697.
- De Flora S and Ramel C (1988) Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. *Mutat Res* 202:285-306.

- Deng HL and Zhang JT (1991) Anti-lipid peroxidative effect of ginsenoside Rb1 and Rg1. *Chin Med J* 104:395-398.
- Fragiorge EJ, Spanó MA and Antunes LMG (2007) Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Biol* 30:449-455.
- Frei H and Würgler 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 and Würgler FE (1995) Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat Res* 334:247-258.
- Frei H, Clements J, Howe D and Würgler FE (1992) The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 279:21-33.
- Geetha T, Saini A and Kaur IP (2006) Ginseng extract exhibits antimutagenic activity against induced mutagenesis in various strains of *Salmonella typhimurium*. *Indian J Exp Biol* 44:838-841.
- Gentile JM, Rahimi S, Zwiesler J, Gentile GJ and Ferguson LR (1998) Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumor agents. *Mutat Res* 402:289-298.
- Gewirtz DA (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57:727-741.

- Goeptar AR, Koppele JMT, Lamme EK, Pique JM, Vermeulen NPE (1993) Cytochrome P450-2B1-mediated one-electron reduction of adriamycin - A study with rat-liver microsomes and purified enzymes. *Mol Pharmacol* 44:1267-1277.
- Graf U and van Schaik N (1992) Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 271:59-67.
- Graf U, Frei H, Kägi A, Katz AJ and Würigler FE (1989) Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 222:359-373.
- Graf U, Abraham SK, Guzmán-Rincón J and Würigler FE (1998) Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 402:203-209.
- Graf U, Heo O and Olvera-Ramirez O (1992) The genotoxicity of chromium (VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. *Mutat Res* 266:197-203.
- Graf U, Würigler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB and Kale PG (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen* 6:153-188.
- Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA, Williams DK, Gentry WB, Cui Y and Ang CYW (2002) Cytochrome P450 phenotypic ratios for predicting herb-drug interactions in humans. *Clin Pharmacol Ther* 72:276-287.
- Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA, Williams DK, Gentry WB, Cui Y and Ang CYW (2005) Clinical assessment of effects of botanical supplementation on cytochrome P450 phenotypes in the elderly: St John's wort, garlic oil, *Panax ginseng* and *Ginkgo biloba*. *Drugs Aging* 22:525-539.

- Hällström I and Blank A (1985) Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster*. I. Chromosomal determination of some cytochrome P-450-dependent reactions. *Chem Biol Interact* 56:151-171.
- Hofseth LJ and Wargovich MJ (2007) Inflammation, cancer, and targets of ginseng. *J Nutr* 137:183S-185S.
- Hou JP (1977) The chemical constituents of ginseng plants. *Comp Med East West* 5:123-145.
- Idaomar M, El-Hamss R, Bakkali F, Mezzouq N, Zhiri A, Baudoux D, Munoz-Serrano A, Liemans V and Alonso-Moraga A (2002) Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 513:61-68.
- Islaih M, Halstead BW, Kadura IA, Reid-Hubbard JL, Flick F, Altizer JL, Thom DJ, Monteith DK, Newton RK and Watson DE (2005) Relationships between genomic, cell cycle, and mutagenic responses of TK6 cells exposed to DNA damaging chemicals. *Mutat Res* 578:100-116.
- Ivanova T, Han Y, Son HJ, Yun YS and Song JY (2006) Antimutagenic effect of polysaccharide ginsan extracted from *Panax ginseng*. *Food Chem Toxicol* 44:517-521.
- Kang J, Lee Y, No K, Jung E, Sung J, Kim Y and Nam S (2002) Ginseng intestinal metabolite-I (GIM-I) reduces doxorubicin toxicity in the mouse testis. *Reprod Toxicol* 16:291-298.
- Kastenbaum MA and Bowman KO (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res* 9:527-549.

- Kennedy DO, Haskell CF, Wesnes KA and Scholey AB (2004) Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with *Panax ginseng*. *Pharmacol Biochem Behav* 79:401-411.
- Kim YH, Park KH and Rho HM (1996) Transcriptional activation of the Cu, Zn-superoxide dismutase gene through the AP2 site by ginsenoside Rb2 extracted from a medicinal plant, *Panax ginseng*. *J Biol Chem* 271:24539-24543.
- Kumar R, Grover SK, Divekar HM, Gupta AK, Shvam R and Srivastava KK (1996) Enhanced thermogenesis in rats by *Panax ginseng*, multivitamins and minerals. *Int J Biometerol* 39:187-191.
- Laohavechvanich P, Kangsadalampai K, Tirawanchai N and Ketterman AJ (2006) Effect of different Thai traditional processing of various hot chili peppers on urethane-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*: assessment of the role of glutathione transferase activity. *Food Chem Toxicol* 44:1348-1354.
- Lee TK, Alisson RR, O'Brien KF, Khazanie PG, Johnke RM, Brown R, Bloch RM, Tate ML, Dobbs LJ and Kragel PJ (2004) Ginseng reduces the micronuclei yield in lymphocytes after irradiation. *Mutat Res* 557:75-84.
- Lehmann M, Franco A, Vilar KDSP, Reguly ML and de Andrade HHR (2003) Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 539:167-175.

- Li W, Wanibuchi H, Salim EI, Wei M, Yamamoto S, Nishino H and Fukushima S (2000) Inhibition by ginseng of 1,2-dimethylhydrazine induction of aberrant crypt foci in the rat colon. *Nutr Cancer* 36:66-73.
- Maffei-Facino R, Carini M, Aldini G, Berti F and Rossoni G (1999) *Panax ginseng* administration in the rat prevents myocardial ischemia-reperfusion damage induced by hyperbaric oxygen: evidence for an antioxidant intervention. *Planta Med* 65:614-619.
- Meijerman I, Beijnen JH and Schellens JHM (2006) Herb-drug interactions in oncology: focus on mechanisms of induction. *Oncologist* 11:742-752.
- Mezzoug N, Elhadri A, Dallouh A, Amkiss S, Skali NS, Abrini J, Zhiri A, Baudoux D, Diallo B, El Jaziri A and Idaomar M (2007) Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutat Res* 629:100-110.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G and Gianni L (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56:185-229.
- Navarro R, Busnadiago I, Ruiz-Larrea MB and Ruiz-Sanz JI (2006) Superoxide anions are involved in doxorubicin-induced ERK activation in hepatocyte cultures. *Ann NY Acad Sci* 1090:419-428.
- Panwar M, Samarth R, Kumar M, Yoon WJ and Kumar A (2005) Inhibition of benzo(a)pyrene induced lung adenoma by *Panax ginseng* extract, EFLA400, in Swiss albino mice. *Biol Pharm Bull* 28:2063-2067.
- Pool-Zobel BL, Bub A, Muller H, Wollowsky I and Rechkemmer G (1997) Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of

- a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis* 18:1847-1850.
- Radad K, Gille G, Liu L and Rausch W-D (2006) Use of ginseng in medicine with emphasis on neurodegenerative disorders. *J Pharmacol Sci* 100:175-186.
- Ramji S, Lee C, Inaba T, Patterson AV and Riddick DS (2003) Human NADPH-cytochrome P450 reductase overexpression does not enhance the aerobic cytotoxicity of doxorubicin in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 63:6914-6919.
- Rauscher R, Edenharder R and Platt KL (1998) *In vitro* antimutagenic and *in vivo* anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids. *Mutat Res* 413:129-142.
- Reay JL, Kennedy DO and Scholey AB (2005) Single doses of *Panax ginseng* (G115) reduce blood glucose levels and improve cognitive performance during sustained mental activity. *J Psychopharmacol* 19:357-365.
- Rhee YH, Ahn JH, Choe J, Kang KW and Joe C (1991) Inhibition of mutagenesis and transformation by root extracts of *Panax ginseng* in vitro. *Planta Med* 57:125-128.
- Saner C, Weibel B, Würzler FE and Sengstag C (1996) Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Mol Mutagen* 27:46-58.
- 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.

- Shao ZH, Xie JT, Vanden Hoek TL, Mehendale S, Aung H, Li CQ, Qin Y, Schumacker PT, Becker LB and Yuan CS (2004) Antioxidant effects of American ginseng berry extract in cardiomyocytes exposed to acute oxidant stress. *Biochim Biophys Acta* 1670:165-171.
- Silva LP, Costa-Cruz JM, Spanó MA and Graf U (2006) Genotoxicity of vesicular fluid and saline extract of *Taenia solium* metacestodes in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 47:247-253.
- Sinigaglia M, Lehmann M, Baumgardt P, Amaral VS, Dihl RR, Reguly ML and Andrade HHR (2006) Vanillin as a modulator agent in SMART test: inhibition in the steps that precede *N*-methyl-*N*-nitroso-urea-, *N*-ethyl-*N*-nitroso-urea-, ethylmethanesulphonate- and bleomycin-genotoxicity. *Mutat Res* 607:225-230.
- Spanó MA, Frei H, Würzler FE and Graf U (2001) Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis* 16:385-394.
- Tellez MGO, Rodriguez HB, Olivares GQ, Sortibrán ANC, Cetto AA and Rodriguez-Arnaiz R (2007) Phytotherapeutic extract of *Equisetum myriochaetum* is not genotoxic either in the in vivo wing somatic test of *Drosophila* or in the in vitro human micronucleus test. *J Ethnopharmacol* 111:182-189.
- Valadares BLB, Graf U and Spanó MA (2008) Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol* 46:1103-1110.

- Wang W, Zhao Y, Rayburn ER, Hill DL, Wang H and Zhang R (2007) *In vitro* anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*. *Cancer Chemother Pharmacol* 59:589-601.
- Wang Z, Zheng Q, Liu K, Li G and Zheng R (2006) Ginsenoside Rh2 enhances antitumour activity and decreases genotoxic effect of cyclophosphamide. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98:411-415.
- Yance Jr DR and Sagar SM (2006) Targeting angiogenesis with integrative cancer therapies. *Integr Cancer Ther* 5:9-29.
- Yoshikawa M, Sugimoto S, Nakamura S and Matsuda H (2007) Medicinal flowers. XI.¹⁾ Structures of new dammarane-type triterpene diglycosides with hydroperoxide group from flower buds of *Panax ginseng*. *Chem Pharm Bul* 55:571-576.
- You J-S, Huang H-F and Chang Y-L (2005) *Panax ginseng* reduces adriamycin-induced heart failure in rats. *Phytother Res* 19:1018-1022.
- Yun TK (1996) Experimental and epidemiological evidence of cancer preventive effects of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Nutr Res* 54:71-81.

Table 1 - Results of the *Drosophila* wing spot test (SMART) in the marker-heterozygous (MH) and balancer-heterozygous (BH) progeny of the standard cross (ST) after chronic treatment of larvae with *P. ginseng* (Pg) and doxorubicin (DOX)

Genotypes and treatments		Number of flies (N)	Spots per fly (number of spots) and statistical diagnosis ^a				Spots with <i>mwh</i> clone ^c (n)	Frequency of clone formation/10 ⁵ cells/ cell division ^d (n/NC) ^{e,f}	Recombination (%)	Inhibition ^g (%)
<i>P. ginseng</i> (mg/mL)	DOX (mg/mL)		Small single spots (1-2 cells) ^b m=2	Large single spots (>2 cells) ^b m=5	Twin spots m=5	Total number of spots m=2				
<i>Mwh/flr³</i>										
0	0	60	0.77 (46)	0.15 (09)	0.02 (01)	0.93 (56)	55	1.87		
0	0.125	60	1.73 (104) +	1.03 (62) +	1.53 (92) +	4.29 (258) +	251	8.57	6.70	84
2.5	0	60	0.95 (57) -	0.13 (08) i	0.10 (06) i	1.18 (71) -	68	2.32	0.45	
5.0	0	60	0.83 (50) -	0.08 (05) -	0.07 (04) i	0.98 (59) -	59	2.01	0.14	
10.0	0	60	0.70 (42) -	0.18 (11) i	0.03 (02) i	0.92 (55) -	59	2.01	0.14	
2.5	0.125	60	0.95 (57) *	0.92 (55)	1.30 (78)	3.17 (190) *	181	6.18	4.31	71
5.0	0.125	60	1.10 (66) *	0.95 (57)	1.30 (78)	3.35 (201) *	199	6.79	4.92	80
10.0	0.125	60	1.37 (82)	1.05 (63)	1.40 (84)	3.82 (229)	222	7.58	5.71	
<i>mwh/TM3³</i>										
0	0	60	0.20 (12)	0.03 (02)		0.23 (14)	14	0.47		
0	0.125	60	0.53 (32) +	0.15 (09) +		0.68 (41) +	41	1.40	0.93	
2.5	0.125	60	0.70 (42)	0.17 (10)		0.87 (52)	52	1.77	1.30	
5.0	0.125	60	0.53 (32)	0.13 (08)		0.66 (40)	40	1.36	0.89	

Marker-trans-heterozygous flies (*mwh/flr³*) and balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) were evaluated. ^aStatistical diagnoses according to Frei and Würzler [1988; 1995]. *U*-test, two-sided; probability levels: -, negative; +, positive; i, inconclusive; P_≤0.05 vs. untreated control; *, P_≤0.05 vs. DOX alone. ^bIncluding rare *flr³* single spots. ^cConsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots. ^dCalculated according to Frei *et al.* (1992). ^eNumbers in square brackets indicate the induction frequencies corrected for spontaneous incidence estimated from the negative controls. ^fC=48,800 (approximate number of cells examined per fly). ^gCalculated according to Abraham (1994). ^hBalancer chromosome *TM3* does not carry the *flr³* mutation.

Table 2 - *Drosophila* wing spot test (SMART) results in marker-heterozygous (MH) and balancer-heterozygous (BH) progeny of the high bioactivation (HB) cross after the chronic treatment of larvae with *P. ginseng* (*Pg*) and doxorubicin (DOX).

Genotypes and treatments		Number of flies (N)	Spot per fly (number of spots) statistical diagnosis ^a				Spots with <i>mwh</i> clone ^c (n)	Frequency of clone formation/10 ⁵ cells per cell division ^d (n/NC) ^{e,f}	Recombination (%)	Inhibition ^g (%)
<i>Pg</i> (mg/mL)	DOX (mg/mL)		Small single spots (1-2 cells) ^b m=2	Large single spots (>2 cells) ^b m=5	Twin spots m=5	Total spots m=2				
<i>mwh/flr³</i>										
0	0	60	0.47 (28)	0.13 (08)	0.05 (03)	0.65 (39)	38	1.29		
0	0.125	60	1.88 (113) +	2.45 (147) +	2.05 (123) +	6.38 (383) +	373	12.73	11.44	91.0
2.5	0	60	0.55 (33) -	0.05 (03) -	0.07 (04) i	0.67 (40) -	38	1.29	0.0	-
5.0	0	60	0.52 (31) -	0.05 (03) -	0.07 (04) i	0.63 (38) -	37	1.26	-0.03	-
10.0	0	60	0.50 (30) -	0.10 (06) i	0.02 (01) i	0.62 (37) -	36	1.22	-0.07	-
2.5	0.125	60	1.43 (86) *	1.42 (85) *	1.75 (105)	4.60 (276) *	270	9.22	7.93	90.0
5.0	0.125	60	1.73 (104)	2.22 (133)	2.62 (157) *	6.57 (394)	387	13.21	11.92	31.0
10.0	0.125	60	1.47 (88) *	1.67 (100) *	2.12 (127)	5.25 (315) *	307	10.48	9.19	92.0
<i>mwhTM3³</i>										
0	0	60	0.12 (07)	0.03 (02)		0.15 (09)	9	0.3		
0	0.125	60	0.53 (32) +	0.05 (03) i		0.58 (35) +	35	1.19	0.89	
2.5	0.125	60	0.40 (24)	0.07 (04)		0.47 (28)	28	0.95	0.65	
10.0	0.125	60	0.37 (22)	0.03 (02)		0.40 (24)	24	0.81	0.51	

Marker-trans-heterozygous flies (*mwh/flr³*) and balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) were evaluated. ^aStatistical diagnoses according to Frei and Würzler [1988; 1995].

U-test, two-sided; probability levels: -, negative; +, positive; i, inconclusive; P_≤0.05 vs. untreated control; *, P _≤ 0.05 vs. DOX alone. ^bIncluding rare *flr³* single spots.

^cConsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots. ^dCalculated according to Frei *et al.* (1992). ^eNumbers in square brackets indicate the induction frequencies corrected for spontaneous incidence estimated from the negative controls. ^fC=48,800 (approximate number of cells examined per fly).

^gCalculated according to Abraham (1994). ^hBalancer chromosome *TM3* does not carry the *flr³* mutation.