



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

**EFEITO PROTETOR DE PROANTOCIANIDINAS DE SEMENTES DE *Vitis
vinifera* L. (Vitaceae) CONTRA EFEITOS GENOTÓXICOS DO CLORIDRATO
DE DOXORRUBICINA, EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila
melanogaster***

Aluno: Alexandre Azenha Alves de Rezende

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

**UBERLÂNDIA – MG
2008**



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

EFEITO PROTETOR DE PROANTOCIANIDINAS DE SEMENTES DE *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) CONTRA EFEITOS GENOTÓXICOS DO CLORIDRATO DE DOXORRUBICINA, EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*

Aluno: Alexandre Azenha Alves de Rezende

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Genética).

**UBERLÂNDIA – MG
2008**



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

**EFEITO PROTETOR DE PROANTOCIANIDINAS DE SEMENTES DE *Vitis*
vinifera L. (Vitaceae) CONTRA EFEITOS GENOTÓXICOS DO CLORIDRATO
DE DOXORRUBICINA, EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila*
*melanogaster***

Aluno: Alexandre Azenha Alves de Rezende

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Examinadores: Prof^a Dr^a Daisy Maria Fávero Salvadori – UNESP

Prof^a Dr^a Heloísa Helena Rodrigues de Andrade – ULBRA

Data da defesa:

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

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R467e Rezende, Alexandre Azenha Alves de, 1983-
Efeito protetor de proantocianidinas de sementes de *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) contra efeitos genotóxicos do cloridrato de Doxorrubicina, em células somáticas de *Drosophila melanogaster* / Alexandre Azenha Alves de Rezende. - 2008.
54 f. : il.

Orientador: Mário Antônio Spanó.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Mutagênese - Teses. 2. *Drosophila melanogaster*. I. Spanó, Mário Antônio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575.224.4

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

Palavras Chave: Antigenotoxicidade, doxorrubicina, *Drosophila melanogaster*, flavonóides, proantocianidinas, Somatic Mutation And Recombination Test - SMART, taninos condensados, *Vitis vinifera*.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mário Antônio Spanó, que acreditou e confiou em mim, pela orientação, dedicação, incentivo e amizade, tornando possível a realização deste trabalho.

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

À Prof^a Dr^a Daisy Maria Fávero Salvadori, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (Botucatu, São Paulo); e à Prof^a Dr^a Heloísa Helena Rodrigues de Andrade, da Universidade Luterana do Brasil - ULBRA (Canoas, Rio Grande do Sul), por aceitarem o convite para participar da banca examinadora dessa Dissertação, pela leitura do texto, e valiosas sugestões.

Aos meus pais, Carlos Henrique Alves de Rezende e Irina Maria Azenha Alves de Rezende, pelo exemplo, amor, ajuda e compreensão pelas minhas ausências e, acima de tudo, por acreditarem em mim.

À minha irmã, Camila Azenha Alves de Rezende, pelo amor e apoio de todas as horas.

À minha avó, Palmyra Gobby Azenha, pelo amor, e que, de alguma forma, está presente. Saudade!

À minha namorada Karina de Paula Rezende, pelo companheirismo, força, amor, e por vivenciar cada momento desse sonho.

Aos amigos, companheiros do Laboratório de Mutagênese, Prof. Dr. Bruno Lassmar Bueno Valadares, Prof^a MSc. Denise Gonçalves Pereira, Prof. Dr. Edson José Fragiorge, Prof^a MSc. Neila Coelho de Sousa, Prof^a Dr^a Silmara de Moraes

Pantaleão, e Prof^a MSc. Zaira da Rosa Guterres, pela amizade, aprendizado e discussões científicas.

A todos os meus amigos, que além de acreditarem no meu potencial e compreenderem as minhas ausências, pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos da PGGB, pelos momentos de tensão, alegria e trabalho que compartilhamos ao longo dessa jornada.

À Prof^a Dr^a Ana Maria Bonetti, pelo incentivo e exemplo de dedicação.

A todos os novos e velhos integrantes do GRUPO PET/BIOLOGIA – UFU, pelo apoio, incentivo, momentos de descontração e ensinamentos que levarei comigo para sempre.

Ao Sr. Paulo Roberto Moderno pela assistência técnica no Laboratório de Mutagênese da UFU.

À todos o meu muito obrigado.

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 abreviações

µg	Micrograma.
¹ O ₂	Oxigênio singlete.
BH	Heterozigoto balanceado/balancer-heterozygous.
BHA	Hidroxi anisol butilado/butylated hydroxyanisole.
BHT	Hidróxi tolueno butilado/butylated hydroxytoluene.
CAS	Chemical abstract service.
CHL	Chinese hamster lung.
ddY	Deutschland, Denken, and Yoken.
DNA	Ácido desoxirribonucléico/deoxyribonucleic acid.
DOX	Doxorrubicina/doxorubicin.
FAO	Food and agriculture organization.
FEC	Fluoracil-epirrubicina-ciclofosfamida.
<i>flr</i> ³	Flare.
FM	Frequency of mutation.
FR	Frequency of recombination.
FT	Frequency of total spots.
g	Gramas.
GSPE	Grape seed proanthocyanidin extract.
GSPs	Grape seed proanthocyanidins.
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio.
HB	Cruzamento de alta bioativação/high bioactivation cross.
HOCL	Ácido hipocloroso.
IDA	Ingestão diária aceitável.
JECFA	Joint expert committee on food additives.
Kg	Quilograma.
L	Lipídio.
L•	Radical lipídico.
LH	Ácido graxo polinsaturado.
LO•	Radical alcóxila.

LOO [•]	Radical peroxila.
MH	Trans-heterozigoto marcado/marker-heterozygous.
mL	Mililitro/mililiter.
<i>mwh</i>	Multiple wing hairs.
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo.
NADP	Nicotinamide adenine dicnucleotide phosphate.
NO [•]	Óxido nítrico.
O ₂ [•]	Radical superóxido.
OH [•]	Radical hidroxil.
ONOO ⁻	Peroxinitrito.
ORR	DDT-resistant Oregon R.
PAs	Proantocianidinas/proanthocyanidins.
PhOH	Phenolic antioxidants.
RNA	Ribonucleic acid.
ROS	Reactive oxygen species.
SMART	Somatic mutation and recombination test.
ST	Cruzamento padrão/standard cross.
UV	Ultra violeta.
WHO	World Health Organization.

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Estapas da lipoperoxidação (Ferreira & Matsubara, 1997).....	03
Figura 2. Estrutura básica dos flavonóides (Wollgast <i>et al.</i> , 2001).....	06
Figura 3. Estrutura química do núcleo flavan-3-ol (Adaptado de Ikegami <i>et al.</i> , 2007).....	09
Figura 4. Unidades monoméricas das principais proantocianidinas (Sun & Spranger, 2005).....	10
Figura 5. Exemplo de proantocianidina do Tipo A (A) e do Tipo B (B).....	11
Figura 6. Aspecto fenotípico dos descendentes dos cruzamentos ST e HB: A) trans-heterozigoto marcado ($mwh + / + flr^3$) - asas de borda lisa; B) heterozigoto balanceado ($mwh + / + TM3, Bd^6$) - asas de borda serrilhada.....	17
Figure 1. Contribution of recombination and mutation (in percentage) to total wing spot induction observed in MH individuals of the ST and HB crosses treated with DOX (0.125 mg/mL) alone and in association with different concentrations of GSPs (1.680; 3.375 or 6.750 mg/mL).....	53

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1. Classificação das proantocianidinas de acordo com o padrão de hidroxilação (ou substituição) da molécula de flavan-3-ol (Sun & Spranger, 2005).....	10
Table 1. Summary of results obtained with the <i>Drosophila</i> 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 grape seeds proanthocyanidins (GSPs) and doxorubicin (DXR)	51
Table 2. Summary of results obtained with the <i>Drosophila</i> wing spot test (SMART) in the marker-heterozygous (MH) and balancer-heterozygous (BH) progeny of the high bioactivation cross (HB) after chronic treatment of larvae with grape seeds proanthocyanidins (GSPs) and doxorubicin (DXR).....	52

Sumário

	Página
Capítulo 1 – Fundamentação Teórica	
1. Radicais livres.....	01
2. Antioxidantes.....	05
3. Compostos Fenólicos e Flavonóides.....	06
4. Proantocianidinas.....	09
5. Cloridrato de Doxorrubicina.....	13
6. Somatic Mutation And Recombination Test – SMART.....	16
7. Referências.....	18
Capítulo 2 - Manuscript for Mutation Research	
Protective effects of grape (<i>Vitis vinifera</i> L.) seeds proanthocyanidins on DNA damage induced by doxorubicin in somatic cells of <i>Drosophila melanogaster</i>	29

Abstract

Proanthocyanidins (PAs), also known as condensed tannins, are naturally occurring oligomers and polymers of flavan-3-ol monomer units widely found in leaves, flowers, fruits, seeds, nuts and barks of many plants. Grape seeds proanthocyanidins (GSPs) has been used as nutritional supplements, as antioxidant, in preventing atherosclerosis, cardiovascular diseases and for dislipidemy treatment. The anthracycline antibiotic adriamycin (doxorubicin - DOX) is a cancer chemotherapeutic agent that interfere with topoisomerase II enzyme and generate free radicals. In the present study, GSPs (1.680; 3.375 or 6.750 mg/mL) alone were examined for genotoxicity and the same concentrations of GSPs in association with DOX (0.125 mg/mL) were examined for antigenotoxicity, using the standard (ST) and high bioactivation (HB) versions of the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. The results observed in both crosses were rather similar. GSPs itself did not show genotoxicity at the doses used. GSPs suppressed the DNA damage induced by DOX in a dose-dependent manner. Comparison of the frequencies of wing spots in the marker-heterozygous (MH) flies and balancer-heterozygous (BH) flies, from both crosses, indicated that recombination was a major response for treatment with DOX alone. Simultaneous treatments demonstrated that GSPs has anti-mutagenic and anti-recombinogenic activities. Nevertheless, the anti-recombinogenic activity was a major response.

Key-words: SMART, anti-oxidants, phenolic compounds, condensed tannin.

Resumo

Proantocianidinas (PAs), também conhecidas como taninos condensados, são oligômeros e polímeros de unidades monoméricas de flavan-3-ol, naturalmente encontradas em folhas, flores, frutos, sementes, castanhas e cascas de muitas plantas. Proantocianidinas de sementes de uva (GSPs) são utilizadas como suplementos nutricionais, antioxidantes, na prevenção da aterosclerose, doenças cardiovasculares e dislipidemia. O antibiótico antraciclínico adriamicina (doxorubicina - DOX), é um quimioterápico usado no tratamento do câncer, o qual interage com a enzima topoisomerase II e também é um gerador de radicais livres. No presente estudo, GSPs (1,680; 3,375 ou 6,750 mg/mL), foram avaliadas em relação à genotoxicidade. As mesmas concentrações foram associadas à DOX (0,125 mg/mL) para avaliação da antigenotoxicidade, usando as versões padrão (ST) e de alta-bioativação (HB) do teste para detecção de mutação e recombinação em asas de *Drosophila melanogaster*. Os resultados obtidos nos dois cruzamentos foram similares. GSPs não demonstraram genotoxicidade nas doses utilizadas. GSPs inibiram o dano ao DNA induzido pela DOX, de forma dose-dependente. Comparando as frequências de manchas observadas nas asas das moscas heterozigotas marcadas (MH) e nas heterozigotas balanceadas (BH), foi verificado que a principal resposta ao tratamento com DOX foi recombinação. Nos tratamentos simultâneos, GSPs demonstraram atividade anti-mutagênica e anti-recombinogênica. No entanto, a ação anti-recombinogênica foi preponderante.

Palavras-chave: SMART, anti-oxidante, compostos fenólicos, tanino condensado.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. Radicais Livres

Radicaais livres são átomos ou moléculas com um ou mais elétrons não pareados em seu orbital, o que os tornam extremamente reativos (Halliwell, 2000). Os radicaais livres atuam como agentes oxidantes, pois tendem a adquirir elétrons para estabilizar o seu orbital de valência (Yu, 1994).

A instabilidade eletrônica dos radicaais livres favorece o surgimento de novas espécies reativas, o que pode desencadear sucessivas reações oxidativas de grande implicação para a célula, a menos que o processo seja detido por um agente antioxidante (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007).

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 radicaais livres derivados do oxigênio, tem sido utilizado o termo “espécies reativas de oxigênio” (*reactive oxygen species – ROS*). Dentre os quais podem se destacar o radical hidroxil (OH^\bullet), superóxido (O_2^\bullet), e o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (Anderson, 1996). 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 radicaais livres (não possuem elétron desemparelhado), podem participar de reações que levam à produção de radicaais livres, sendo, portanto, chamadas de pró-oxidantes (Yu, 1994).

Além dos radicaais livres derivados do oxigênio, existem aqueles derivados do nitrogênio, como o óxido nítrico (NO^\bullet) e peroxinitrito (ONOO^-) (Bianchi & Antunes, 1999), e do cloro, como o ácido hipocloroso (HOCL) (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007).

As vias endógenas de formação desses agentes incluem a cadeia respiratória, a qual converte o oxigênio molecular em água e respostas auto-imunes (Chen *et al.*, 2000). Como fonte exógena, pode-se ressaltar as radiações ionizantes e não ionizantes, gases naturais tóxicos como ozônio, assim como produtos químicos e toxinas (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007). A síntese desses compostos é aumentada durante processos infecciosos e inflamatórios, bem como após exercícios físicos (Borek, 1997; 2004).

Estresse oxidativo é uma expressão usada para descrever vários processos deletérios resultantes de um desequilíbrio entre a formação excessiva de ROS e uma limitada defesa antioxidante. Pequenas flutuações na concentração desses oxidantes exercem um papel na sinalização intracelular, enquanto aumentos descontrolados acarretam danos às proteínas, aos lipídeos, polissacarídeos e ao DNA (Drodge, 2002)

De forma contínua, uma pequena fração do O_2 disponível para a mitocôndria sofre redução incompleta, gerando o radical superóxido, seja por meio da reação catalizada pela NADH desidrogenase ou do ciclo da ubiquinona (Turrens, 1997; da Silva *et al.*, 2003).

Muitos xenobióticos interagem com a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, aumentando a quantidade de O_2^{\bullet} produzido por diferentes mecanismos. Alguns estimulam o estresse oxidativo por bloquear o transporte de elétrons na cadeia respiratória, aumentando o nível de redução dos transportadores subseqüentes. Outros xenobióticos podem aceitar um elétron, de um transportador da cadeia eletrônica, e transferi-lo para o oxigênio molecular (ciclo redox), estimulando a formação de O_2^{\bullet} , sem que haja inibição da cadeia respiratória (Turrens, 2003).

A lipoperoxidação é um marcador do estresse oxidativo, a qual acarreta danos à bicamada lipídica e aos ácidos graxos da membrana celular (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007).

O radical hidroxila é reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação (Ferreira & Matsubara, 1997), sendo que esta pode ser dividida em três etapas: iniciação, propagação e terminação (Cerqueira *et al.*, 2007). Estas etapas são apresentadas na **Figura 1**, onde **L** representa o lipídio.

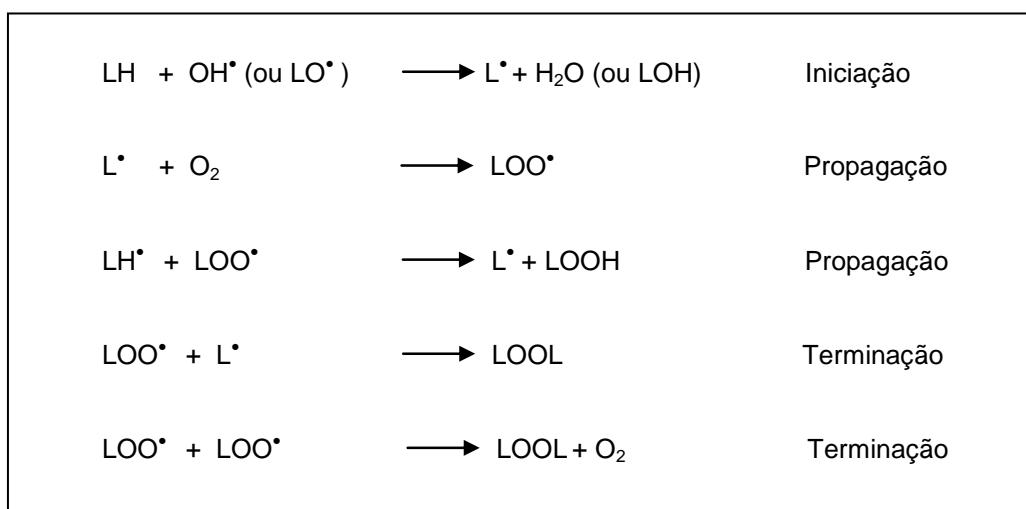


Figura 1. Estapas da lipoperoxidação (Ferreira & Matsubara, 1997).

A reação inicia-se com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado (LH) da membrana celular. Tal seqüestro pode ser realizado pelo OH^\bullet ou pelo LO^\bullet (radical alcoxila), com conseqüente formação do L^\bullet (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o L^\bullet reage rapidamente com o O_2 , resultando em LOO^\bullet (radical peroxila), que por sua vez seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado, formando novamente o L^\bullet na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais (L^\bullet e LOO^\bullet) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até formarem compostos mais estáveis (Ferreira & Matsubara, 1997; Lykkesfeldt & Svendsen, 2007).

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o importante papel dos radicais livres e outros oxidantes, como grandes responsáveis pelo envelhecimento, e pelas doenças degenerativas, como o câncer, doenças cardiovasculares, hepatopatias, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais. Os danos ao DNA causados pelos radicais livres também desempenham papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (Atoui *et al.*, 2005)

A ingestão de compostos naturais com capacidade antioxidante, tais como compostos fenólicos, vem sendo amplamente reconhecida nos últimos anos, pela

medicina preventiva, como importante na prevenção de doenças crônico-degenerativas (Weisburger & Williams, 2000; Wollgast & Anklam, 2000).

2. Antioxidantes

Organismos aeróbios dependem do oxigênio para a sua sobrevivência, mas a sua presença leva à oxidação de moléculas e estruturas celulares. Sendo assim, esses organismos tiveram que desenvolver ao longo da evolução, mecanismo de defesa com o estresse oxidativo (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007).

Sob condições fisiológicas, o organismo dispõe de um integrado sistema de defesa antioxidante que inclui elementos enzimáticos e não enzimáticos, para proteger células e tecidos dos efeitos deletérios de diferentes espécies de radicais livres (Yu, 1994).

O termo antioxidante refere-se a uma grande variedade de compostos com mecanismos de ação distintos. Segundo Halliwell (1997), “antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas às concentrações de um substrato oxidável, retarda significativamente ou impede a oxidação desse substrato”.

Além das defesas naturais, as quais incluem glutathione redutase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase, determinadas vitaminas (ácido ascórbico, α tocoferol, β -caroteno), compostos inorgânicos (selênio), compostos sintéticos (hidroxi anisol butilado – BHA, hidróxi tolueno butilado – BHT) e muitos polifenóis derivados de plantas, também apresentam ação antioxidante (Sheu *et al.*, 2006).

Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade de antioxidantes sintéticos apresentarem efeito tóxico, fazendo com que o *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA) da *Food and Agriculture Organization* (FAO), e *World Health Organization* (WHO) alterarem a ingestão diária aceitável (IDA) destas substâncias como resultado desses estudos (Würtzen, 1990).

Dentre os compostos antioxidantes de ocorrência natural, os fenólicos têm recebido atenção especial nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase (Omoni & Aluko, 2005).

As proantocianidinas (PAs) ou taninos condensados estão entre os mais poderosos agentes antioxidantes conhecidos (Zhang *et al.*, 2005).

3. Compostos Fenólicos e Flavonóides

Metabólitos secundários são substâncias produzidas em pequenas quantidades. Ao contrário dos produtos do metabolismo primário, nem sempre estão envolvidos em funções vitais do vegetal (Alves, 2001) e, geralmente, possuem características químicas muito variadas (Hall, 2006).

Os principais grupos de metabólitos secundários oriundos dos vegetais são os alcalóides, terpenos, taninos, flavonóides e glicosídeos (Hall, 2006).

Entre os metabólitos secundários, os mais estudados são os flavonóides, considerados fenóis ou polifenóis por sua estrutura química, formada por 15 átomos de carbono no seu núcleo fundamental (estrutura C₆-C₃-C₆) consistindo de dois anéis aromáticos (benzeno) (**A** e **B**) ligados por um anel heterocíclico oxigenado (pirano ou pirona) (**C**) (**Figura 2**) (Bloor, 2001; Wollgast *et al.*, 2001; Havsteen, 2002; Cerqueira *et al.*, 2007).

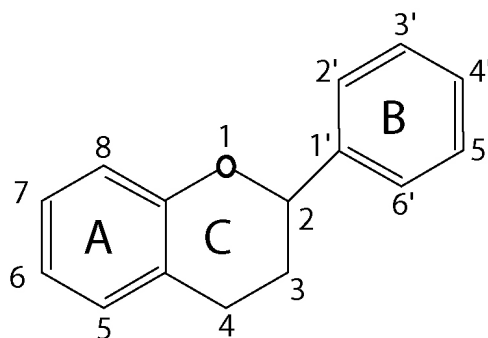


Figura 2. Estrutura básica dos flavonóides (Wollgast *et al.*, 2001).

Durante muito tempo acreditou-se que os metabólitos secundários fossem produzidos sem uma função específica, apenas como produtos finais de reações, sendo até considerados como anomalias (Maraschin & Verpoorte, 1999). Essa visão foi alterada e a cada dia descobre-se um pouco mais sobre o papel que desempenham no desenvolvimento fisiológico bem como as interações destes compostos com o ambiente e outros organismos (Maraschin & Verpoorte, 1999; Newman *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003).

Flavonóides são formados da combinação de derivados sintetizados da fenilalanina (via metabólica do ácido chiquímico e ácido acético). Os padrões de distribuição dependem do grau de acesso à luminosidade, especialmente raios ultravioletas, pois a formação dos flavonóides é acelerada pela luz, já que uma de suas atividades é de proteção contra raios UV (Aherne & O'brien, 2002; Burns *et al.*, 2001). Sendo assim, nas plantas cultivadas em estufas, ou em locais com baixa incidência de raios UV, a concentração de flavonóides fica reduzida. Por exemplo, vegetais do Reino Unido apresentam de 4 a 5 vezes menos flavonóides que os mesmos vegetais encontrados na Espanha ou na África do Sul, onde a incidência desses raios é maior (Price *et al.*, 1995).

Nos vegetais, inúmeras funções têm sido atribuídas aos flavonóides, em particular, a atividade antioxidante (Di Carlo, 1999). A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras, dada à sua estrutura química. Estas características desempenham um papel importante no seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação, como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (Haslan, 1996; Soares, 2002; Chun *et al.*, 2005).

Embora as evidências sejam claras sobre a ação dos fenóis e polifenóis contra os danos oxidativos causados pelas espécies reativas de oxigênio, eles podem, em algumas circunstâncias, tais como o ascorbato e os carotenóides, mostrarem características pró-oxidantes (Valko *et al.*, 2004; Fragiorge *et al.*, 2007).

Desde então, tem-se procurado estabelecer uma correlação entre a ingestão de flavonóides e a ocorrência de diversas doenças tais como as coronarianas e o câncer. Evidências epidemiológicas correlacionam os elevados consumos de flavonóides, com menores riscos de desenvolvimento de câncer, em concordância com estudos *in vitro*, evidenciando a capacidade de determinados flavonóides inibirem a carcinogênese (Havsteen, 2002; Ren *et al.*, 2003; Arts & Hollman, 2005; Engelbrecht *et al.*, 2007).

Dentre os mais de 8000 flavonóides já descritos (Hodek *et al.*, 2002), muitos desses compostos apresentam uma grande gama de efeitos biológicos

benéficos à saúde humana, incluindo ações antioxidantes, anticarcinogênica, anti-ulcerativa, anti-trombótica, antiinflamatória, anti-alérgica, antimicrobiana, imunomodulatória, vasodilatadora e analgésica, além de serem compostos importantes no mecanismo de proteção dos vegetais (Wollgast & Anklam, 2000; Burns *et al.*, 2001; Kähkönen *et al.*, 2001; Aherne & O'brien, 2002; Sellapan *et al.*, 2002).

Entre os flavonóides de maior interesse estão as proantocianidinas (PAs), também conhecidas como taninos condensados. As PAs são amplamente encontradas em todo reino vegetal, em diferentes tecidos e órgãos das plantas, mais especificamente, nos vacúolos das células que compõem estas estruturas. Ao mesmo tempo em que garante proteção contra predação, as PAs são responsáveis pela adstringência em bebidas, como vinhos, sucos e chás, e ainda possuem efeitos benéficos à saúde humana (Dixon *et al.*, 2005).

4. Proantocianidinas

As PAs são oligômeros ou polímeros de unidades monoméricas de flavan-3-ol (Xie *et al.*, 2003; Dixon *et al.*, 2005; Ikegami *et al.*, 2007).

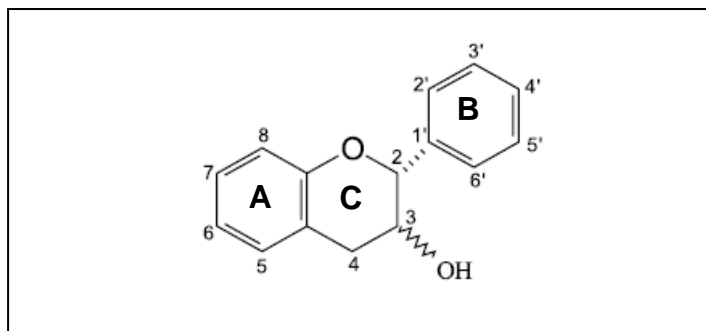


Figura 3. Estrutura química do núcleo flavan-3-ol (Adaptado de Ikegami *et al.*, 2007).

O padrão de hidroxilação (ou substituição) da molécula de flavan-3-ol permite separar as proantocianidinas em várias classes (**Tabela 1**), como por exemplo: procianidinas, prodelfinidinas, propelargonidinas, profisentinidinas e prorobinetidinas, sendo as duas primeiras classes, as mais comuns (Sun & Spranger, 2005).

As procianidinas e as prodelfinidinas, quando hidrolisadas, liberam, respectivamente, cianidinas e delfinidinas, sendo que a unidade formadora das procianidinas são catequinas e epicatequinas (**Figura 4**) e das prodelfinidinas, galocatequinas e epigalocatequinas (Sun & Spranger, 2005).

A estrutura das proantocianidinas é variada e não depende apenas do tipo do núcleo flavan-3-ol, mas também do grau de polimerização, do tipo de radical substituído bem como a posição onde essa substituição acontece (Dixon, 2005).

De acordo com o padrão de ligação entre as unidades monoméricas formadoras das proantocianidinas, pode-se classificá-las em dois tipos: A e B. Nas do Tipo B, os monômeros estão unidos por ligação do tipo C₄ – C₈ ou C₄ – C₆. Já as do Tipo A, apresentam uma ligação extra do tipo C₂ – O – C₇ ou C₂ – O – C₅ (Sun & Spranger, 2005) (**Figura 5**).

Tabela 1. Classificação das proantocianidinas de acordo com o padrão de hidroxilação (ou substituição) da molécula de flavan-3-ol (Sun & Spranger, 2005)

Classe de Proantocianidina	Unidade monomérica constitutiva	Padrão de substituição					
		3	5	7	3'	4'	5'
Procianidina	Catequina, Epicatequina.	OH	OH	OH	OH	OH	H
Prodelfinidina	Galocatequina, Epigalocatequina.	OH	OH	OH	OH	OH	OH
Propelargonidina	Afizelequina	OH	OH	OH	H	OH	H
Profisentidina	Fisetinidol	OH	H	OH	OH	OH	H
Prorobinetidina	Robinetinidol	OH	H	OH	OH	OH	OH

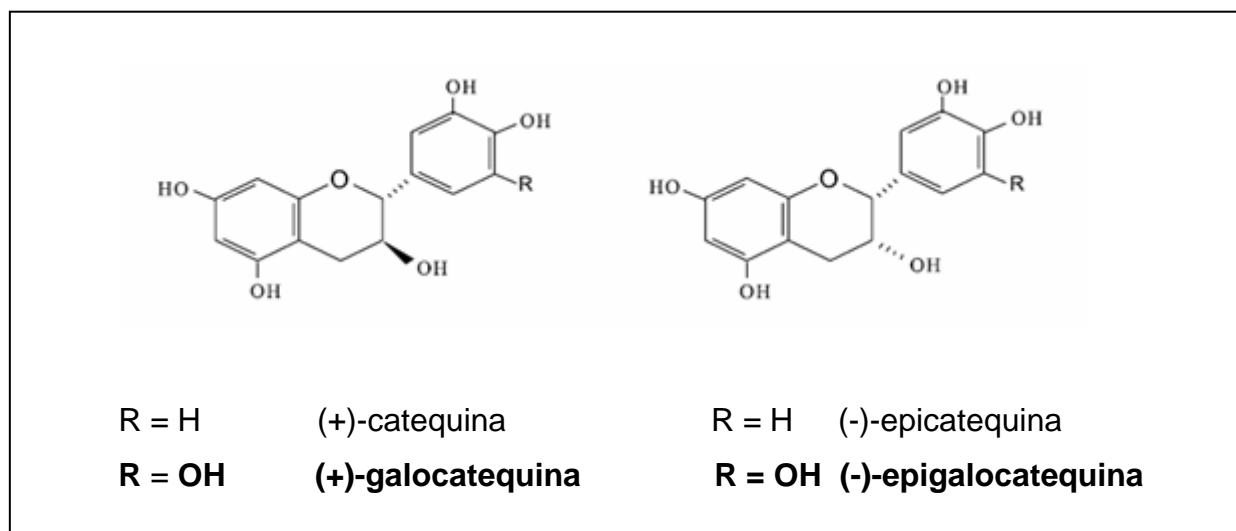


Figura 4. Unidades monoméricas das principais proantocianidinas (Sun & Spranger, 2005).

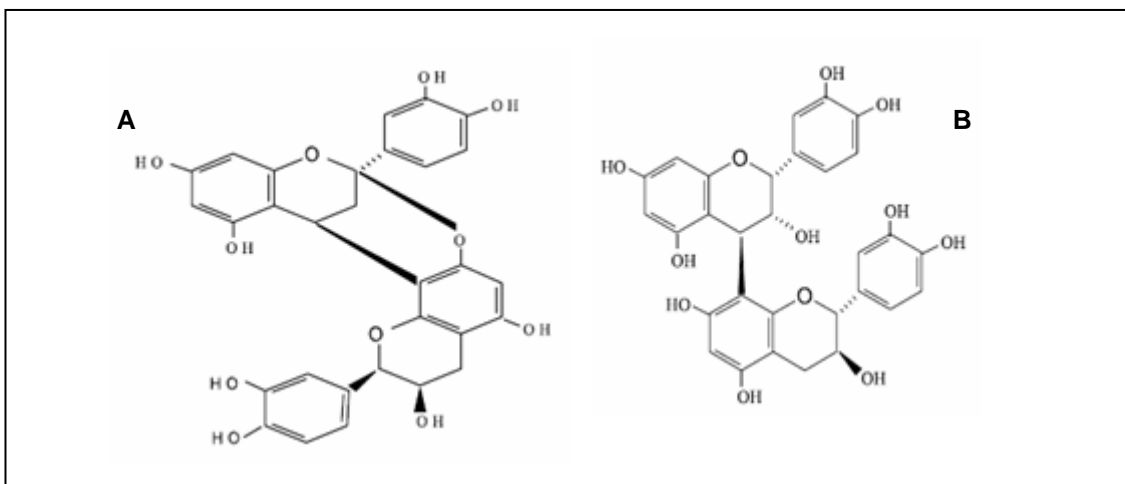


Figura 5. Exemplo de proantocianidina do Tipo A (A) e do Tipo B (B).

Nos vegetais, as PAs podem ser encontradas em frutos, flores, castanhas e sementes, como por exemplo, nas sementes de uvas (Zhang *et al.*, 2005).

As proantocianidinas de sementes de uva (grape seed proanthocyanidins - GSPs) possuem variadas atividades farmacológicas e biológicas, incluindo: cardioprotetora, antitumoral, bactericida, antiinflamatória e antioxidante (Li *et al.*, 2001; Bagchi *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2003).

Entre as atividades mencionadas, a antitumoral e antioxidante se sobressaem. GSPs além de serem potentes seqüestradores de radicais livres e antioxidantes, tanto *in vivo* como *in vitro* (Bagchi *et al.*, 1997; Bagchi *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2005), podem ser consideradas como agentes quimiopreventivos, pois além de aumentarem a atividade de quimioterápicos, como a doxorubicina, em células tumorais, diminuem a toxicidade em células saudáveis (Bagchi *et al.*, 2001; Bagchi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005).

A comercialização de extratos ricos em proantocianidinas de sementes de uva tem aumentado no mercado nutricional mundial, principalmente em países como os Estados Unidos, Austrália e Japão. Apesar desse aumento, existem poucos trabalhos sobre a toxicidade de proantocianidinas (Yamakoshi *et al.*, 2002).

GSPs administradas via oral demonstram não possuir atividade mutagênica nos testes de mutação reversa, aberração cromossômica e micronúcleo em ratos (Yamakoshi *et al.*, 2002).

Takahashi e colaboradores (1999) demonstraram que procianidina B2, nas concentrações 694 µg/mL e 521 µg/mL, induziram poliploidia em células de pulmão de hamster chinês, na presença e na ausência de fração microssomal S-9. Já em estudos com linfócitos humanos, procianidinas B2 não induziram poliploidia, sendo que a concentração utilizada foi de 500 µg/mL (Propp & Schimmer, 1991).

Bombardeli e Morazzoni (1995) demonstraram que a administração de 60 mg/Kg por dia de GSPs, durante 6 meses em ratos, e 12 meses em cachorros, não provocaram nenhum efeito tóxico nesses animais, bem como mutagênico ou teratogênico. Ainda de acordo com esses autores, a dose letal média (DL50) em ratos, em teste de toxicidade aguda, é superior à 4g/kg.

Testes de mutagenicidade realizados com *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100) demonstraram resultados negativos em todas as 6 concentrações utilizadas, sendo a mínima de 156 µg/mL e máxima de 5000 µg/mL (Takahashi *et al.*, 1999).

5. Cloridrato de Doxorrubicina

Na quimioterapia são utilizados antibióticos anti-tumorais, tais como bleomicina, actinomicina, mitomicina, e antraciclinas (Gragg *et al.*, 1997).

A adriamicina (cloridrato de doxorrubicina - DXR) é um antibiótico antineoplásico da classe das antraciclinas, isolado de *Streptomyces peucetius*, variedade *caesius* (Ashikawa *et al.*, 2004). A DXR é utilizada no tratamento de tumores sólidos, tais como os de mama, ovário e pulmão, além de também ser empregada no tratamento de leucemia aguda (Rocha *et al.*, 2001; Minotti *et al.*, 2004).

A DXR possui múltiplos mecanismos de citotoxicidade. Um desses mecanismos envolve a biotransformação redutiva do anel quinona a radical semiquinona, o qual pode exercer efeito tóxico direto, ou participar de reações de óxido-redução, e envolver enzimas como a citocromo P450 redutase, NADH desidrogenase, e xantina oxidase (Gewirtz, 1999; Ramji *et al.*, 2003). DXR ainda pode interagir com a enzima topoisomerase II, a qual controla a topologia das regiões super espiralizadas do DNA, ligando-se e causando a abertura da dupla fita. Sendo assim, os tratamentos com DXR impedem a re-ligação das duplas fitas seccionadas pela topoisomerase II, causando lesão permanente à molécula do DNA (Minotti *et al.*, 2004).

Em cães, o gene que codifica a topoisomerase II está localizado no cromossomo 17, região 17q21, bem próximo ao oncogene ErB-2, o qual é comumente amplificado em cânceres mamários (Ahern *et al.*, 1996).

A co-amplificação ou deleção do gene da topoisomerase II α foi relatada em cerca de 90% dos casos de amplificação de ErB-2, em linhagens celulares de tumores mamários humanos. A amplificação do gene da topoisomerase II foi associada ao aumento correspondente de sua expressão protéica e à maior sensibilidade ao tratamento com DXR, enquanto que a deleção do gene levou à diminuição da expressão da proteína, e uma conseqüente resistência à droga, tanto em pacientes como em experimentos conduzidos *in vitro* (Lynch *et al.*, 1997; Järvinen *et al.*, 2000).

Em experimentos mais avançados (fase III), Pritchard e colaboradores (2006) observaram que o subgrupo de pacientes com tumores com hiper-

expressão de ErB-2 apresentou melhor evolução quando tratados com FEC (fluoracil-epirrubicina-ciclofosfamida), corroborando, assim, os dados anteriormente achados por Lynch (1997) e Järvinen (2000).

A administração de DXR pode levar à cardiopatia, dose dependente cumulativa (Zhou *et al.*, 2001), por causar danos no metabolismo basal no tecido cardíaco (Kalender *et al.*, 2005). A cardiotoxicidade induzida por DXR é atribuída à geração de radicais livres, sendo que os mesmos podem causar lipoperoxidação, acarretando alterações na integridade da membrana celular, além de alterar a função mitocondrial, o que também favorece a síntese desses radicais (Zhou *et al.*, 2001).

A DXR é ativa durante todo o ciclo celular, incluindo a interfase. Os tecidos de rápida proliferação, como os tumorais, células da medula óssea, mucosa gastrointestinal e oral, e os folículos pilosos, são os mais sensíveis aos efeitos antiproliferativos da DXR. Este quimioterápico não é absorvido pelo trato gastrointestinal. Por ser irritante aos tecidos, deve ser administrado por via intravenosa (Charrois & Allen, 2004).

A metabolização da DXR ocorre principalmente no fígado. Após a administração, os níveis plasmáticos desse quimioterápico diminuem, com uma meia-vida terminal de 20 a 48 horas. Aproximadamente 40% da dose administrada é recuperada na bile ou fezes em 5 dias; 5% a 12% desse fármaco e seus metabólitos, como o 13-OH-doxorrubicinol, aparecem na urina durante o mesmo período (Chang *et al.*, 2003).

Indução de apoptose por diferentes vias, incluindo a ativação de NF- κ B, alquilação de macromoléculas, danos à membrana celular e mutação são eventos relacionados aos efeitos da DXR (Sadkuza *et al.*, 2002; Ashikawa *et al.*, 2004; Fragiorge *et al.*, 2007) tanto em células sadias como tumorais (Steinherz *et al.*, 1991; Richardson & Johnson, 1997).

Muitos trabalhos têm testado a ação de substâncias com a finalidade de reduzir a toxicidade da DXR (Antunes & Takahashi, 1998; Takeuchi, 2002; Costa & Nepomuceno, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Antunes *et al.*, 2007; Valadares *et al.*, 2007; Fragiorge *et al.*, 2007). Uma abordagem usada para minimizar os efeitos adversos da DXR consiste em usá-la em associação com antioxidantes a fim de reduzir o estresse oxidativo (Lamson & Brignal, 1999; Quiles *et al.*, 2002).

O agente citoprotetor ideal seria aquele capaz de permitir a intensificação da dose-resposta dos quimioterápicos, conferindo proteção específica aos tecidos normais e preservando o efeito anti-tumoral, além de apresentar pequena e/ou controlável toxicidade (Souza *et al.*, 2000).

Proantocianidinas de sementes de uva (GSPs), já conhecidas pela sua atividade antioxidante, também são capazes de potencializar o efeito da DXR por meio de imunomodulação, em estudos realizados *in vivo* e *in vitro* (Zhang *et al.*, 2005) e, ao mesmo tempo, é capaz de proteger as células saudáveis, demonstrando, assim, sua capacidade quimiopreventiva.

6. Somatic Mutation And Recombination Test - SMART

Agentes químicos, físicos e biológicos presentes no ambiente podem levar a danos celulares e moleculares. Essas lesões podem afetar processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica, além de causar mutações e aberrações cromossômicas, fenômeno esse que pode levar ao desenvolvimento de câncer e à morte celular. Pelo fato de causarem lesões no material genético, e potencialmente gerarem tumores em seres humanos, esses agentes são normalmente conhecidos como genotóxicos (Costa & Menk, 2000).

Ensaio biológicos têm sido freqüentemente utilizados no monitoramento da bioatividade de substâncias potencialmente tóxicas, tais como extratos, frações e compostos químicos isolados (Noldin *et al.*, 2003).

A *Drosophila melanogaster* é um organismo eucarioto com tempo de geração curto, prole numerosa, baixo custo e de fácil manutenção em laboratório. Além disso, as características morfológicas e genéticas são amplamente conhecidas (Graf *et al.*, 1996).

O teste de mutação e recombinação somática em células de asa de *D. melanogaster* (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART), tem sido utilizado para avaliação do potencial mutagênico e/ou antimutagênico de substâncias naturais, sintéticas e misturas complexas de origem ambiental (Silva *et al.*, 2006; Pantaleão *et al.* 2007; Fragiorge *et al.*, 2007; Valadares *et al.*, 2007). O SMART foi desenvolvido por GRAF *et al.* (1984; 1989) e aprimorado por Graf & van Schaik (1992).

Este teste é realizado por meio de cruzamentos experimentais utilizando três linhagens portadoras dos marcadores recessivos das células das asas: *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e *flare* (*flr³*, 3-38,8): [1] linhagem “*multiple wing hairs*” (*mwh*) com constituição genética *y; mwh jv*; [2] linhagem “*flare-3*” (*flr³*), com constituição genética *flr³ / In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*; [3] linhagem “*ORR; flare-3*” (*ORR; flare-3*), com constituição genética *ORR; flr³ / In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*, sendo esta última, portadora de genes de expressão elevada de enzimas do complexo citocromo P450, localizados nos cromossomos 1 e 2, provenientes da linhagem *Oregon R*, resistente ao DDT.

Com estas linhagens são realizados dois diferentes cruzamentos: 1) cruzamento padrão (ST – *standard cross*) entre machos “*mwh*” e fêmeas virgens “*flr³*” (Graf *et al.*, 1984; 1989); 2) cruzamento de alta bioativação (HB - *high bioactivation cross*) entre machos “*mwh*” e fêmeas virgens “*ORR; flr³*” (Graf & van Schaik, 1992). Assim sendo, o cruzamento padrão é útil na detecção de agentes genotóxicos diretos, enquanto o cruzamento de alta bioativação é útil na detecção de agentes genotóxicos indiretos, ou promutágenos, que necessitam de ativação metabólica para induzir efeitos genotóxicos.

Ambos os cruzamentos produzem dois tipos de progênie: 1) Trans-heterozigoto marcado (*mwh + / + flr³*) (MH), que é distinguido pela borda lisa da asa (**Figura 6 - A**); B) Heterozigoto balanceado (*mwh + / + TM3, Bd^S*) (BH), com borda de asa serrilhada (**Figura 6 - B**). Nos adultos emergentes MH as manchas mutantes aparecem como manchas simples, apresentando o fenótipo “*mwh*” ou “*flare*”, ou como manchas gêmeas mostrando áreas adjacentes “*mwh*” e “*flare*”. As manchas simples são produzidas por mutação, aberração cromossômica (deleção), recombinação, ou não-disjunção mitótica, enquanto que as manchas gêmeas ocorrem exclusivamente por recombinação. Nos indivíduos BH as manchas mutantes aparecem apenas como manchas simples do tipo “*mwh*”, produzidas por mutação, aberração cromossômica (deleção) ou não-disjunção. A perda da heterozigose desses marcadores nas células dos discos imaginais da larva, por tratamento com um composto genotóxico, leva à formação de clones de células mutantes, os quais se expressam, após a metamorfose, em uma mancha mutante na asa (Spanó & Graf, 1998).

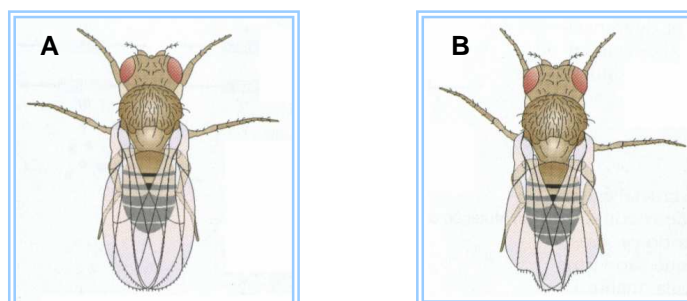


Figura 6. Aspecto fenotípico dos descendentes dos cruzamentos ST e HB: A) trans-heterozigoto marcado (*mwh + / + flr³*) - asas de borda lisa; B) heterozigoto balanceado (*mwh + / + TM3, Bd^S*) - asas de borda serrilhada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências

AHERN, T. E., BIRD, R. C., BIRD, A. E., WOLFE, L. G. 1996. Expression of the oncogene c-erbB-2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. **Am. J. Vet. Res.**, 57, p.693-696.

AHERNE, S. A. & O'BRIEN, N. M. 2002. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, 18, p.75-81.

ALVES, H. M. 2001. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cad. Tem. Quím. Nova**, 3, p.10-15.

ANTUNES, L. M. G. & TAKAHASHI, C. S. 1998. Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. **Mutat. Res.**, 419, p.137–143.

ANTUNES, L. M. G., BUENO, R. B. L., DIAS, F. L., BIANCHI, M. L. P. 2007. Acetylsalicylic acid exhibits anti-clastogenic effects on cultured human lymphocytes exposed to doxorubicin. **Mutat. Res.**, 626, p.155–161.

ARTS, I. C. W. & HOLLMAN, P. C. H. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, 81, p.317S-325S.

ASHIKAWA, K., SHISHODIA, S., FOKT, I., PRIEBE, W., AGGARWALL, B. B. 2004. Evidence that activation of nuclear factor KB is essential for the cytotoxic effects of doxorubicin and its analogues. **Biochem. Pharmacol.**, 67, p.353-364.

ATOUI, A. K., MANSOURI, A., BOSKOU, G., KEFALAS, P. 2005. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chem.**, 89, p.27-36.

BAGCHI, D., GARG, A., KROHN, R. L., BAGCHI, M., BAGCHI, D. J., BALMOORI, J., STOHS, S. J. 1998. Protective effects grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and

DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. **Gen. Pharmacol.**, 30, p.771 –776.

BAGCHI, D., GARG, A., KROHN, R. L., BAGCHI, M., TRAN, M. X., STOHS, S. J. 1997. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E and grape seed proanthocyanidin extract in vitro. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.**, 95, p.179– 189.

BAGCHI, D., RAY, S. D., PATEL, D., BAGCHI, M. 2001. Protection against drug- and chemical-induced multiorgan toxicity by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. **Drugs Exp. Clin. Res.**, 27, p.3–15.

BAGCHI, D., SEN, C. K., RAY, S. D., DAS, D. K., BAGCHI, M., PREUSS, H. G., VINSON, J. A. 2003. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. **Mutat. Res.**, 523, p.87–97.

BIANCHI, M. L. P. & ANTUNES, L. M. G. 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, 12, p.123-130.

BLOOR, S. J. 2001. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. **Methods Enzymol.**, 335, p.3-14.

BOMBARDELLI, E. & MORAZZONI, P., 1995. *Vitis vinifera* L. **Fitoterapia**, LXVI, p.291–317.

BOREK, C. 1997. Antioxidants and Cancer. **Sci. Med.**, 4, p.51-62.

BOREK, C. 2004. Dietary antioxidants and human cancer. **Integr. Cancer Ther.**, 3, p.333-341.

BURNS, J., GARDNER, P. T., MATTHEWS, D., DUTHIE, G. G. LEAN, M. E. J., CROZIER, A. 2001. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **J. Agric. Food Chem.**, 49, p.5797-57808.

CERQUEIRA, F. M., MEDEIROS, M. H. G., AUGUSTO, O. 2007. Dietetic antioxidants: controversies and perspectives. **Quím. Nova**, 30, p.441-449.

CHANG, H., JUNG, K., KIM, T. 2003. Mitomycin C, doxorubicin and 5-fluorouracil may not improve survival over 5-fluorouracil alone in people with curatively resected gastric cancer. **Cancer Treat. Rev.**, 29, p.131-133.

CHARROIS, G. J. R. & ALLEN, T. M. 2004. Drug release rate influences the pharmacokinetics, biodistribution, therapeutic activity, and toxicity of pegylated liposomal doxorubicin formulations in murine breast cancer. **Biochim. Biophys. Acta**, 1663, p.234-246.

CHEN, K., SUH, J., CARR, A. C., MORROW, J. D., ZEIND, J., FREI, B. 2000. Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, 279, p.E1406–E1412.

CHUN, S.-S., VATEM, D. A., LIN, Y.-T., SHETTY, K. 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process. Biochem.**, 40, p.809-816.

COSTA, R. M. A. & MENK, C. F. M. 2000. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotec. Ci. & Desenv.**, 3, p.24-26.

COSTA, W. F. & NEPOMUCENO, J. C. 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, p.18–24.

DA SILVA, M. M., SARTORI, A., BELISLE, E., KOWALTOWSKI, A. J. 2003. Ischemic preconditioning inhibits mitochondrial respiration, increases H₂O₂ release and enhances K⁺ transport. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, 285, p.H154–H162.

DI CARLO, G., MASCOLO, N., IZZO, A. A., CAPASSO, F. 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sci.**, 65, p.337-353.

DIXON, R. A., XIE, D-Y., SHARMA, S. B. 2005. Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? **New Phytol.**, 165, p.9-28.

DRODGE, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, 82, p.47-95.

ENGELBRECHT, A. M., MATTHEYSE, M., ELLIS, B., LOOS, B., THOMAS, M., SMITH, R., PETERS, S., SMITH, C., MYBURGH, K. 2007. Proanthocyanidin from grape seeds inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces apoptosis in a colon cancer cell line. **Cancer Lett.**, 258, p.144–153.

FERRREIRA, A. L. A. & MATSUBARA, L. S. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, 43, p.61-68.

FRAGIORGE, E. J., SPANÓ, M. A., ANTUNES, L. M. G. 2007. Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genet. Mol. Biol.**, 2, p.449-455.

GEWIRTZ, D. A. 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the anthracycline antibiotics andriamycin and daunorubicin. **Biochem. Pharmacol.**, 57, p.727-741.

GRAF, U. & VAN SCHAİK, N. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.**, 271, p.59-67.

GRAF, U., FREI, H., KÄGI, A., KATZ, A. J., WÜRGLER, F. E. 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutat. Res.**, 222, p.359-373.

GRAF, U., SPANÓ, M. A., RINCÓN, J. G., ABRAHAM, S. K., ANDRADE, H. H., 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. **Afr. Newslett. Occup. Health Saf.**, 6, p.9 -13.

GRAF, U., WÜRGLER, F. E., KATZ, A. J., FREI, H., JUON, H., HALL, C. B., KALE, P. G. 1984. Somatic Mutation And Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Environ. Mutagen.**, v. 6, p.153-188.

HALL, R. D. 2006. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New Phytol.**, p.453-468.

HALLIWELL, B. 1997. Antioxidants: the basics – what they are and how to evaluate them. **Adv. Pharmacol.**, 38, p.3-20.

HALLIWELL, B. 2000. The antioxidant paradox. **Lancet**, 355, p.1179-1180.

HASLAM, E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug and medicines: possible modes of action. **J. Nat. Prod.**, 59, p. 205-215.

HAVSTEEN, B. H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Therap.**, 96, p.67-202.

HODEK, P., TREFIL, P., STIBOROVA, M. 2002. Flavonoids – potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chem. Biol. Interact.**, 139, p.1-21.

IKEGAMI, A., EGUCHI, S., KITAJIMA, A., INOUE, K., YONEMORI, K. 2007. Identification of genes involved in proanthocyanidin biosynthesis of persimmon (*Diospyros kaki*) fruit. **Plant Sci.**, 172, p.1037-1047.

JÄRVINEN, T. A. H., TANNER, M., RANTANEN, V., BÄRLUND, M., BORG, A., GRÉNMAN, S., ISOLA, J. 2000. Amplification and deletion of topoisomerasell α associated with ErbB-2 amplification and effect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. **Am. J. Pathol.**, 156, p.839-847.

KÄHKÖNEN, M. P., HOPIA A. I., HEINONEN, M. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. **J. Agricult. Food Chem.**, 49, p.4076-4082.

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, p.39-45.

LAMSON, D. W. & BRIGNALL, M. S. 1999. Antioxidants in cancer therapy: their actions and interactions with oncology therapies. **Altern. Med. Rev.**, 4, p.304-329.

LI, W. G., ZHANG, X. Y., WU, Y. J., TIAN, X. 2001. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. **Acta Pharmacol. Sin.**, 22, p.1117-1120.

LYKKESFELDT, J. & SVENDSEN, O. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. **Veterinary Journal**, 173, p.502-511.

LYNCH, B. J., GUINEE, D. G., HOLDEN, J. A. 1997. Human DNA topoisomerase II - alpha: a new marker of cell proliferation in invasive breast cancer. **Hum. Pathol.**, 28, p.1180-1188.

MARASCHINI, M. & VERPOORTE, R. 1999. Engenharia do metabolismo secundário. **Biotec. Ci. & Desenv.**, 23, p.24-28.

MINOTTI, G., MENNA, P., SALVATORELLI, E., CAIRO, G., GIANNI, L. 2004. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacol. Rev.**, 56, p.185-229.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M., SNADER, K. M. 2003. Natural products as a source of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, 66, p.1022-1037.

NOLDIN, V. F., MONACHE, F. D., YUNES, R. A. 2003. Composição Química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Quím. Nova**, 26, p.331-334.

OMONI, A. O. & ALUKO, R. E. 2005. The anticarcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. **Trends Food Sci. Technol.**, 16, p.344–350.

PANTALEÃO, S. M., ALCÂNTARA, A. V., ALVES, J. P. H., PAVANIN, L. A., GRAF, U., REZENDE, A. A. A., VALADARES, B. L. B., FRAGIORGE, E. J., SOUZA, N. C., GUTERRES, Z. R., SPANÓ, M. A. 2007. Assessing the impact of pollution on the Japaratuba River in Brazil using the *Drosophila* wing spot test. **Environ. Mol. Mutagen.**, 48, p.96-105.

POPP, R. & SCHIMMER, O. 1991. Induction of sister-chromatid exchanges (SCE), polyploidy, and micronuclei by plant flavonoids in human lymphocyte cultures. A comparative study of 19 flavonoids. **Mutat. Res.**, 246, p.205–213.

POULSEN, H. E., 2005. Oxidative DNA modifications. **Exp. Toxicol. Pathol.**, 57, p.161–169.

PRICE, S. F.; BREEN, P. J.; VALLADAO, M.; WATSON, B. T. 1995. Cluster sun exposure and quercetin in Pinot Noir grapes and wines. **Am. J. Enol. Vitic.**, 46, p.187-194.

PRITCHARD, K. I., SHEPHERD, L. E., O'MALLEY, F. P., ANDRULIS, I. I., TU, D.; BRAMWELL, V. H., LEVINE, M. N. 2006. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. **N. Engl. J. Med.**, 18, p.2102-2111.

QUILES, J. L., HUERTAS, J. R., BATTINO, M., MATAIX, J., RAMIREZ-TORTOSA, M. C. 2002. Antioxidant nutrients and andriamycin toxicity. **Toxicology**, 180, p.79-95.

RAMJI, S., LEE, C., INABA, T., PATTERSON, A. V., RIDICK, D. S. 2003. Human NADPH-cytochrome p450 reductase over expression does not enhance the aerobic cytotoxicity of doxorubicin in human breast cancer cell lines. **Cancer Res.**, 63, p.6914-6919.

REN, W., QIAO, Z., WANG, H., ZHU, L. ZHANG, L. 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. **Med. Res. Rev.**, 23, p.519-534.

RICHARDSON, D. S. & JOHNSON, S. A. 1997. Anthracyclines in haematology: preclinical studies, toxicity and delivery systems. **Blood. Rev.**, 11, p.201–223.

SADZUKA, Y., YAMASHITA, Y., SUGIYAMA, T., SONOBE, T. 2002. Effect of dihydrokainate on the antitumor activity of doxorubicin. **Cancer Lett.**, 179, p.157-163.

SELLAPPAN, S., AKOH, C. C., KREWER, G. 2002. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **J. Agricult. Food Chem.**, 50, p.2432-2438.

SHEU, S. S., NAUDURI, D., ANDERS, M. W. 2006. Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. **Biochim. Biophys. Acta**, 1762, p.256-265.

SILVA, L. P., COSTA-CRUZ, J. M., SPANÓ, M. A., GRAF, U. 2006. Genotoxicity of vesicular fluid and saline extract of *Taenia solium* metacestodes in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Environ. Mol. Mutagen.**, 47, p.247-253.

SINGH, R. P., TYAGI, A. K., DHANALAKSHMI, S., AGARWAL, R., AGARWAL, C. 2004. Grape seed extract inhibits advanced human prostate tumor growth and

angiogenesis and upregulates insulin-like growth factor binding protein-3. **Int. J. Cancer**, 5, p.733–740.

SOARES, S. E. 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, 15, p.71-81.

SOUZA, C. A., VIGORITO, A. C., ARANHA, F. J. P., OLIVEIRA, G. B., EID, A. B., RUIZ, M. A. 2000. Terapêutica citoprotetora em pacientes tratados com quimio e/ou radioterapia antineoplásica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 22, p. 123-128.

SPANÓ, M. A & GRAF, U. 1998. Segundo Taller sobre SMART: um método para detectar las actividades mutagénica y recombinogénica em células somáticas de *Drosophila* en la Universidad Federal de Uberlândia (MG), Brasil. **Rev. Int. Contam. Ambient.**, 14, p.111-114.

STEINHERZ, L. J., STEINHERZ, P. G., TAN, C. C., HELLER, G., MURPHY, L. 1991. Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. **J. Am. Med. Assoc.**, 266, p.1672 –1677.

SUN, B. & SPRANGER, I. 2005. Review: Quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes. **Ciência Téc. Vitiv.**, 2, p.59-89.

TAKAHASHI, T., YOKOO, Y., INOUE, T., ISHII, A. 1999. Toxicological studies on procyanidin B-2 for external application as a hair growing agent. **Food Chem. Toxicol.**, 37, p.545–552.

TURRENS, J. F. 1997. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Biosc. Rep.**, 17, p.3-8.

TURRENS, J. F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J. Physiol.**, 552, p.335-344.

VALADARES, B. L. B., GRAF, U., SPANÓ, M. A. 2007. Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. **Food Chem. Toxicol.**, *in press*.

VALKO, M., IZAKOVIC, M., MAZUR, M., RHODES, C. J., TELSER, J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Mol. Cell. Biochem.**, 266, p.37–56.

WEISBURGER, J. H. & WILLIAMS, G. M. 2000. The distinction between genotoxic and epigenetic carcinogens and implication for cancer risk. **Toxicol. Sci.**, 49, p. 231-246.

WOLLGAST, J. & ANKLAN, E. 2000. Review in polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Res. Int.**, p. 423-447.

WOLLGAST, J., PALLARONI, L., AGAZZI, M. E., ANKLAM, E. 2001. Analysis of procyanidins in chocolate by reversed-phase highperformance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection. **J. Chromatogr.**, 926, p.211-220.

WÜRTZEN, G. 1990. Shortcomings of current strategy for toxicity testing of food chemicals: antioxidants. **Food Chem. Toxicol.**, 28, p.743-745.

XIE, D. Y., SHARMA, S. B., PAIVA, N. L., FERREIRA, D., DIXON, R. A. 2003. Role of anthocyanidin reductase, encoded by *BANYULS* in plant flavonoid biosynthesis. **Science**, 299, p.396-399.

YAMAKOSHI, J., SAITO, M., KATAOKA, S., KIKUCHI, M. 2002. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. **Food Chem. Toxicol.**, 40, p.599-607.

YU, B. P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.**,74, p.139-162.

ZHANG, Q., ZHAO, Y., WANG, B., TU, G. 2003. New triterpenoid saponins from *Stelmatocrypton khasianum*. **Chem. Pharm. Bull.**, 5, p.574-578.

ZHANG, X. Y., LI, W. G., WU, Y.J., ZHENG, T. Z., LI, W., QU, S. Y., LIU, N. F. 2005. Proanthocyanidin from grape seeds potentiates anti-tumor activity of doxorubicin via immunomodulatory mechanism. **Int. Immunopharmacol.**, 5, p.1247–1257.

ZHOU S. Y., PALMEIRA C. M., WALLACE K. B. 2001. Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes. **Toxicol. Lett.**, 121, p.151-157.

CAPÍTULO 2

MANUSCRIPT FOR

MUTATION RESEARCH

Manuscript for Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis (17-01-2008)

Protective effects of grape (*Vitis vinifera* L.) seeds proanthocyanidins on DNA damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*

Alexandre Azenha Alves de Rezende ^a, Ulrich Graf ^b, Mário Antônio Spanó ^{a*}

^a Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Mutagênese, Av. Pará 1720, Campus Umuarama, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil

^b Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Sciences, ETH Zurich, CH-8603 Schwerzenbach, Switzerland

Running title: Protective effects of *Vitis vinifera* L.

Corresponding author. Tel.: +55 34 32182505; fax: +55 34 3218 2203.

E-mail address: maspano@ufu.br (M.A. Spanó).

Keywords: Antigenotoxicity; condensed tannin; flavonoids; SMART; Somatic Mutation
And Recombination Test.

Abstract

Proanthocyanidins (PAs), also known as condensed tannins, are naturally occurring oligomers and polymers of flavan-3-ol monomer units widely found in leaves, flowers, fruits, seeds, nuts and barks of many plants. Grape seeds proanthocyanidins (GSPs) has been used as nutritional supplements, as antioxidant, in preventing atherosclerosis, cardiovascular diseases and for dislipidemy treatment. The anthracycline antibiotic adriamycin (doxorubicin - DOX) is a cancer chemotherapeutic agent that interfere with topoisomerase II enzyme and generate free radicals. In the present study, GSPs (1.680; 3.375 or 6.750 mg/mL) alone were examined for genotoxicity and the same concentrations of GSPs in association with DOX (0.125 mg/mL) were examined for antigenotoxicity, using the standard (ST) and high bioactivation (HB) versions of the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. The results observed in both crosses were rather similar. GSPs itself did not show genotoxicity at the doses used. GSPs suppressed the DNA damage induced by DOX in a dose-dependent manner. Comparison of the frequencies of wing spots in the marker-heterozygous (MH) flies and balancer-heterozygous (BH) flies, from both crosses, indicated that recombination was a major response for treatment with DOX alone. Simultaneous treatments demonstrated that GSPs has anti-mutagenic and anti-recombinogenic activities. Nevertheless, the anti-recombinogenic activity was a major response.

Introduction

Proanthocyanidins (PAs), also known as condensed tannins, are naturally occurring polyphenolic bioflavonoids (oligomers and polymers of flavan-3-ol units - the end products of the flavonoid biosynthetic pathway) widely present in bark of many trees, leaves of tea, fruits, nuts and seeds of many plants such as grape (*Vitis vinifera* L.), apple (*Malus domestica* Borkh.), and persimmon (*Diospyros kaki*), where they provide protection against predation (Dixon et al., 2005; Xie & Dixon., 2005; Zhang et al., 2005; Pfeiffer et al., 2006; Ikegami et al., 2007). PAs also give flavor and astringency to beverages such as wine, fruit juices and teas, and have been increasingly recognized as having beneficial effects on human health (Gu et al., 2004; Dixon et al., 2005) due to a wide range of biological and pharmacological activities such as antioxidant (Pinelo et al., 2007; Hatzidimitriou et al., 2007), Anti-inflammatory (Hughes-Formella et al., 2007), cardioprotective (Aldini et al., 2003; Bagchi et al., 2003; Segura et al., 2003; Ranaivo et al., 2004), anti-tumor (Gunjima et al., 2004, Singh et al., 2004; Zhang et al., 2005) and antigenotoxic (Dauer et al., 2003). The major sources of PAs in the American diet are apples (32%), chocolate (17.9%) and grapes (17.8%), and account for a major fraction of the flavonoids ingested in Western diets (Gu et al., 2004).

Grape seeds are a particularly rich source of complex polymers of flavonoids such as PAs, anthocyanidins, and leucoanthocyanidins (Segura et al., 2003). Grape seeds proanthocyanidins (GSPs) have appeared on the market as nutritional supplement mainly in the United States, Australia, Japan, Korea, as well in other countries (Yamakoshi et al., 2002), such as Brazil, where it is used as antioxidant, in preventing atherosclerosis, cardiovascular diseases and for dislipidemy treatment. Prior studies have demonstrated the potent free radical scavenger ability of grape seed procyanidins (da Silva et al., 1991) and grape seeds proanthocyanidin extract (GSPE) both in vitro and in vivo models (Bagchi et al., 2000). PAs extracted from grape seeds were found to be non-mutagenic (Yu & Swaminathan, 1987; Yamakoshi et al., 2002), non-clastogenic and non-aneugenic (Yamakoshi et al., 2002; Erexson, 2003). Results obtained by Zhang et al. (2005) suggested that GSPs have anti-tumor activity and increase the anti-tumor activity of the chemotherapeutic agent doxorubicin.

Doxorubicin (DOX) belongs to the anthracycline family of antitumor antibiotics commonly used to treat a broad range of malignancies. Nevertheless, its therapeutic benefit is limited by acute and chronic cardiotoxicity, often leading to heart failure (Navarro et al., 2006; Bien et al., 2007; Xia et al., 2007). DOX cause DNA strand breaks by topoisomerase II inhibition (Islaih et al., 2005), generate free radical metabolites (Navarro et al., 2006), but can also form formaldehyde-mediated DNA adducts (Spencer et al., 2008). Unless repaired by the cell, the DNA damage caused by DOX can be accumulated, resulting in mutational events and chromosomal aberrations in healthy cells as well as in tumor cells (Islaih et al., 2005). The decrease of DOX genotoxicity in non-tumor cells is the aim that has been achieved experimentally by combined treatments of DOX with free radical scavengers and antioxidants (Amara-Mokrane et al., 1996; Antunes and Takahashi, 1998; Gentile et al., 1998; Antunes et al., 2007; Costa and Nepomuceno, 2006; Tavares et al., 2006; Fragiorge et al., 2007; Valadares et al., 2007).

The wing Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster* has shown to be an efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity (Graf et al., 1996).

The wing SMART in *D. melanogaster* has been successfully used to demonstrate the protective effects of different free radical scavengers on the genotoxicity of DOX (Costa and Nepomuceno, 2006; Fragiorge et al., 2007; Valadares et al., 2007). The wide use of GSPs as nutritional supplement prompted us to study the genotoxicity of a commercial grape seeds proanthocyanidin extract known as Vittis[®] alone and its antigenotoxic effects on DOX-induced somatic mutation and recombination by the wing spot test of *D. melanogaster*.

Results

In this study all compounds were tested chronically (approximately 48 h) in the larval progeny (third instar larvae) from ST cross and HB cross. Each treatment was done in duplicate. The following types of spots were evaluated separately: small single spots with only one or two affected cells, large single spots with more than two affected cells, twin spots and total of spots. The wings of BH flies were mounted and analyzed only when a positive response was obtained in the MH progeny. The data, based on scoring 120 wings (60 wings per treatment), were pooled after verifying that the two independent experiments were in agreement with good reproducibility.

The results obtained for MH (*mwh/flr³*) individuals of the ST cross treated with different concentrations of GSPs alone and those obtained for MH and BH (*mwh/TM3*) individuals of the ST cross treated with different concentrations of GSPs in association with DOX are shown in Table 1. GSPs itself did not show genotoxicity at the doses used ($p > 0.05$), with exception of GSPs 3.375 and 6.750 mg/mL, for large single spots, when compared to negative control ($p < 0.05$). DOX treatment induced positive results for all categories of spots on the wings when compared to negative control ($p < 0.05$). The statistically significant increases of twin spots indicate the recombinogenic activity of DOX. GSPs suppressed the DNA damage induced by DOX in dose-dependent manner. Combined co-treatment with GSPs (1.680; 3.375 and 6.750 mg/mL) and DOX (0.125 mg/mL) presented a reduction statistically significant in all categories of spots (small single, large single, twin and total of spots) observed (with exception of DOX 0.125 mg/mL in association with GSPs 1.680 mg/mL, for small single spots) when compared with DOX alone ($p < 0.05$).

For BH individuals DOX (0.125 mg/mL) induced significant increase in the spot frequencies when compared to negative control ($p < 0.05$). The combined co-treatment with GSPs 1.680 mg/mL and DOX was ineffective in the inhibition of small single spots, large simple spots and total spots when compared to DOX alone ($p > 0.05$). Nevertheless, GSPs (3.375 and 6.750 mg/mL) reduced significantly the frequencies of all categories of spots (with exception of DOX in association with GSPs 3.375 mg/mL, for small single spots).

Comparisons of the clone frequencies observed in the MH and BH flies of the treated series with DOX alone and DOX plus GSPs were done to quantify the mutagenic and recombinogenic potential of the test samples [46,47]. The results showed that the genotoxicity in MH flies was due to mainly mitotic recombination (Table 1). The results obtained show that GSPs had anti-recombinogenic rather than antimutagenic activity.

The results obtained for MH individuals of the HB cross treated with different concentrations of GSPs alone and those obtained for MH and BH individuals of the HB cross treated with different concentrations of GSPs in association with DOX are shown in Table 2. All different concentrations of GSPs tested were negative ($p > 0.05$). DOX treatment induced positive results for all categories of spots on the wings when compared to negative control ($p < 0.05$). In these experimental series, GSPs also suppressed the DNA damage induced by DOX in a dose-dependent manner. Combined co-treatment with GSPs (1.680; 3.375 or 6.750 mg/mL) and DOX (0.125 mg/mL) presented a reduction statistically significant in all categories of spots (small single, large single, twin and total of spots) observed (with exception of DOX 0.125 mg/mL in association with GSPs 1.680 mg/mL, for small single spots) when compared with DOX alone ($p > 0.05$).

For BH individuals DOX induced significant increase in the spot frequencies when compared to negative control ($p < 0.05$). The combined co-treatment with GSPs 1.680 mg/mL and DOX increased the frequency of small single spots (nevertheless this increase was statistically non significant when compared to DOX alone); reduced significantly the frequency of large single spots; and was ineffective to reduce total frequency of spots. GSPs (3.375 and 6.750 mg/mL) reduced significantly the frequencies of all categories of spots (with exception of small single spots).

Comparison of the frequencies of wing spots in the BH and MH descendents indicated that recombination was a major response for treatment with DOX alone (89.69%). Combined treatments demonstrated that GSPs has anti-mutagenic and anti-recombinogenic activities. Nevertheless, the anti-recombinogenic activity was a major response.

Figure 1 shows the contribution of recombination and mutation to total wing spot induction observed in MH individuals of the ST and HB crosses treated with DOX alone and in association with different concentrations of GSPs.

Discussion

The wing spot test (Somatic mutation and recombination test – SMART) in *D. melanogaster* have been shown to be efficient short-term bioassay for the detection of genotoxic or antigenotoxic activity of pure compounds or complex mixtures; are capable of activating enzymatically promutagens and procarcinogens [35]; and are efficient procedures for quantitative determination of the recombinagenic potential of genotoxic agents [49]. In the present study, we used both versions (ST and HB crosses) of SMART to investigate the genotoxicity and antigenotoxicity of GSPs, because PAs are a group of polyphenolic bioflavonoids found in fruits and vegetables, which gained special interest because of their broad health beneficial effects for humans [1].

The results observed in both crosses were rather similar and demonstrated that GSPs itself was neither toxic nor genotoxic at the doses used. These results are in agreement with previous reports that demonstrated that several procyanidins with different degrees of polymerization (dimers, a trimer and a polymer) and extracted from different natural sources were found to be non-mutagenic in the *Salmonella typhimurium* mutagenesis assay system [20]. Procyanidin B-2 showed to be non-mutagenic in bacteria, caused polyploidy but no structural chromosomal aberration in CHL cells, and was negative in micronucleus tests for mutagenicity in mice [50]. Grape seed extract (GSE) containing proanthocyanidin polyphenolic compounds, did not induce acute oral toxicity in Fischer 344 rats, mutagenicity in *S. typhimurium*, and chromosomal aberration in CHL cells and micronucleus in ddY mice [17]. Meganatural™ brand GSE and grape skin extract did not induce statistically significant increase in micronucleated polychromatic erythrocytes in CrI:CD-1®(ICR) BR mouse bone marrow [21].

In this study DOX was used as positive control because it acts as topoisomerase II poison, is a free radical generator and form formaldehyde-mediated DNA adducts [22,25, 26].

The disruption of topoisomerase I and/or II function during DNA replication results in DNA strand breaks, smaller DNA deletions, and other mutations. The DNA strand breaks are repaired by recombination pathways, such as non-

homologous end joining and, less commonly in mammalian cells, homologous recombination [51]. Inhibition of topoisomerase II action during mitosis and meiosis can cause incomplete separation of chromatids and chromosomes, with the consequent production of genomic mutations. Topoisomerase-mediated mutagenicity is important because it can lead not only to drug resistance but also to drug-induced secondary cancers [52].

The highly active, quinone-containing anticancer drugs, such as adriamycin, interact with mammalian microsomes and function as free radical carriers. These quinone drugs augment the flow of electrons from reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) to molecular oxygen as measured by enhanced reduced NADP oxidation and oxygen consumption. This reaction is catalyzed by microsomal protein and produces a free radical intermediate form of the drug, which have the potential to be "site-specific free radicals" that bind to DNA or RNA and either react directly or generate oxygen-dependent free radicals such as superoxide radical or hydroxyl radical to cause the damage associated with their cytotoxic actions [53].

Dox was also used in association with GSPs because GSPs have shown to be potent antioxidant, anti-tumoral and chemopreventive agents [3,7,8], ameliorating the normal cell toxicity associated with chemotherapy [54] and, mainly, because in the present study, GSPs shown to be neither toxic nor genotoxic at the doses used.

Phenolic antioxidants (PhOH) interfere with the oxidation of lipids and other molecules by the rapid donation of hydrogen atom to radicals $ROO\bullet + PhOH \rightarrow ROOH + PhO\bullet$. The phenoxy radical intermediates are relatively stable so they do not initiate (propagate) further radical reactions. They even act as terminators of the reaction chain by interacting with other free radicals. However, under certain conditions, e.g. a high concentration of phenolic antioxidants, the presence of redox-active metals (copper, iron) and a high pH, they may behave as pro-oxidants [55]. When compared the antioxidant capacity of grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) with vitamins C, E and β -carotene, GSPE provides significantly greater protection against free radicals and free radical-induced lipid peroxidation and DNA damage than vitamins C, E and β -carotene [54]. Procyanidin dimers and flavan-3-ols showed very potent antioxidant activities.

Compared to the physiologically active (glutathione, α -tocopherol, ergothioneine) and synthetic (Trolox, BHA, BHT) antioxidants, these compounds exhibited much higher efficacy [56].

In the present study, DOX induced all types of spots (small single, large single and twin spots) on the wings of the MH progeny. These results are in agreement with those observed previously [31-34,57,58]. Small or large single spots can be produced by point mutation, chromosome breakage, and mitotic recombination, while twin spots are exclusively a result of homologous recombination [39]. Due to these positive responses, the wings of BH flies were also mounted and analyzed. A comparison of the results obtained from MH and BH flies was used to quantify the mutagenic and recombinogenic potential of the test samples (86.67% and 89.69% recombination, respectively, for ST cross and HB cross). These results are in agreement with previous observations that DXR preferentially induced recombination rather than other genotoxic events [31,33,34,58]. It suggests that DOX produce primary damage in DNA that is further processed by recombinational DNA repair pathways. Homologous recombination (HR) is the major mechanism used to repair double-strand breaks that result from replication [59] and is also involved in the repair response to anthracycline–DNA adducts [26].

There is a link between recombination and carcinogenesis [60,61]. HR can result in a loss of heterozygosity or genetic rearrangements, which may play a primary role in carcinogenesis, but they are more likely to be involved in secondary and subsequent steps of carcinogenesis by which recessive oncogenic mutations are revealed. Patients, whose cells display an increased frequency of recombination, also have an elevated frequency of cancer [61].

Simultaneously treatment of different concentrations of GSPs plus DOX led to a statistically significant reduction in the frequencies of spots in MH flies in the ST cross and in the HB cross. GSPs revealed an inhibitory effect against the frequency of mutant spots induced by DOX due to an anti-recombinogenic activity. The protective effects were proportional to the concentrations applied, indicating a dose–response correlation which can be attributed to a powerful scavenger ability of GSPs.

Our group has successfully used the SMART assay to demonstrate the protective effects of different free radical scavengers (ascorbic acid and water extract of propolis) on the genotoxicity of DOX [33,34]. To our knowledge, this is the first report of GSPs protective effects against DOX genotoxicity. Comparing the results obtained in the present study, with those obtained in our prior studies, we concluded that GSPs provides significantly greater protection against DOX-induced free radicals and DNA damage.

In conclusion, the present study shows that under the present experimental conditions, GSPs was not toxic and genotoxic in *Drosophila* somatic cells but revealed a protective effect against genotoxicity of DOX due mainly to an anti-recombinagenic activity. The GSPs inhibitory effects were proportional to the concentrations applied, indicating a dose–response relationship which might be attributed to its powerful scavenger ability. Nevertheless, further experiments must be carried out to a better understanding of GSPs mechanism of action and to its safer use in clinical administrations.

Acknowledgements

The authors thank the Universidade Federal de Uberlândia (UFU) and the Brazilian agencies CAPES (for granting scholarship), CNPq and FAPEMIG.

References

- [1] R.A. Dixon, D.-Y. Xie, S.B. Sharma. Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research?, *New Phytol.* 165 (2005) 9-28.
- [2] D.-Y. Xie, R.A. Dixon. Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers?, *Phytochem.* 66 (2005) 2127-2144.
- [3] X.Y. Zhang, W.G. Li, Y.J. Wu, T.Z. Zheng, W. Li, S.Y. Qu, N.F. Liu. Proanthocyanidin from grape seeds potentiates anti-tumor activity of doxorubicin via immunomodulatory mechanism, *Int. Immunopharmacol.* 5 (2005) 1247–1257.
- [4] J. Pfeiffer, C. Kühnel, J. Brandt, D. Duy, P.A.N. Punyasiri, G. Forkmann, T.C. Fischer. Biosynthesis of flavan 3-ols by leucoanthocyanidin 4-reductases and anthocyanidin reductases in leaves of grape (*Vitis vinifera* L.), apple (*Malus x domestica* Borkh.) and other crops, *Plant. Physiol. Biochem.* 44 (2006) 323-334.
- [5] A. Ikegami, S. Eguchi, A. Kitajima, K. Inoue, K. Yonemori. Identification of genes involved in proanthocyanidin biosynthesis of persimmon (*Diospyros kaki*) fruit *Plant Sci.* 172 (2007) 1037-1047.
- [6] L. Gu, M. A. Kelm, J. F. Hammerstone, G. Beecher, J. Holden, D. Haytowitz, S. Gebhardt, R. L. Prior. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption, *J. Nutr.* 134 (2004) 613-617.
- [7] M. Pinelo, A. Ruiz-Rodriguez, J. Sineiro, F. J. Senorans, G. Reglero, M. J. Nunez. Supercritical fluid and solid-liquid extraction of phenolic antioxidants from grape pomace: a comparative study, *Eur. Food Res. Technol.* 226 (2007) 199-205.
- [8] E. Hatzidimitriou, N. Nenadis, M. Z. Tsimidou. Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity (a_w) conditions, *Food Chem.* 105 (2007) 1504-1511.
- [9] B. Hughes-Formella, O. Wunderlich, R. Williams. Anti-inflammatory and skin-hydrating properties of a dietary supplement and topical formulations containing oligomeric proanthocyanidins, *Skin. Pharmacol. Physiol.* 20 (2007) 43-49.

- [10] G. Aldini, M. Carini, A. Piccoli, G. Rossoni, R. M. Facino. Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardioprotection, *Life Sci.* 73 (2003) 2883-2898.
- [11] D. Bagchi, C. K. Sen, S. D. Ray, D. K. Das, M. Bagchi, H. G. Preuss, J. A. Vinson. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract, *Mutat. Res.* 523–524 (2003) 87–97.
- [12] M. A. M. Segura, H. F. Marin, S. E. B. Delgado. Bases farmacológicas y clínicas del extracto de *Vitis vinifera* em patologias asociadas al estrés oxidativo, *Rev. Fitoter.* 3 (2003) 135-144.
- [13] H. R. Ranaivo, M. Diebolt, R. Andriantsitohaina. Wine polyphenols induce hypotension, and decrease cardiac reactivity and infarct size in rats: involvement of nitric oxide, *Br. J. Pharmacol.* 142 (2004) 671–678.
- [14] M. Gunjima, I. Tofani, Y. Kojima, K. Maki, M. Kimura. Mechanical evaluation of effect of grape seed proanthocyanidins extract on debilitated mandibles in rats, *Dent. Mater. J.* 23 (2004) 67-74.
- [15] R. P. Singh, A. K. Tyagi, S. Dhanalakshmi, R. Agarwal, C. Agarwal. Grape seed extract inhibits advanced human prostate tumor growth and angiogenesis and upregulates insulin-like growth factor binding protein-3, *Int. J. Cancer*, 108 (2004) 733-40.
- [16] A. Dauer, A. Hensel, E. Lhoste, S. Knasmuller, V. Mersch-Sundermann, Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of *Hamamelis virginiana* L. in metabolically competent, human hepatoma cells (Hep G2) using single cell gel electrophoresis, *Phytochemistry* 63 (2003) 199-207.
- [17] J. Yamakoshi, M. Saito, S. Kataoka, M. Kikuchi. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds, *Food Chem. Toxicol.* 40 (2002) 599-607.
- [18] J. M. R. da Silva, N. Darmon, Y. Fernandez, S. Mitjavilat. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds, *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991) 1549-1552.
- [19] D. Bagchi, M. Bagchi, S. J. Stohs, D. K. Das, S. D. Ray, C. A. Kuszynski, S. S. Joshi, H. G. Pruess. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract:

- importance in human health and disease prevention, *Toxicology* 148 (2000) 187-197.
- [20] C. -L. Yu, B. Swaminathan. Mutagenicity of proanthocyanidins, *Food Chem. Toxicol.* 25 (1987) 135-139.
- [21] G.L. Erexson. Lack of in vivo clastogenic activity of grape seed and grape skin extracts in a mouse micronucleus assay, *Food Chem. Toxicol.* 41 (2003) 347–350.
- [22] R. Navarro, I. Busnadiego, M.B. Ruiz-Larrea, J.I. Ruiz-Sanz. Superoxide anions are involved in doxorubicin-induced ERK activation in hepatocyte cultures, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1090 (2006) 419-428.
- [23] S. Bien, A. Riad, C. A. Ritter, M. Gratz, F. Olshausen, D. Westermann, M. Grube, T. Krieg, S. Ciecholewski, S. B. Felix, A. Staudt, H.-P. Schultheiss, R. Ewert, U. Völker, C. Tschöpe, H. K. Kroemer. The endothelin receptor blocker bosentan inhibits doxorubicin-induced cardiomyopathy, *Cancer Res.* 67 (2007) 10428-10435.
- [24] L. Xia, L. Jaafar, A. Cashikar, H. Flores-Rozas. Identification of genes required for protection from doxorubicin by a genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae*, *Cancer Res.* 67 (2007) 11411-11418.
- [25] M. Islaih, B.W. Halstead, I.A. Kadura, B. Li, J.L. Reid-Hubbard, L. Flick, J.L. Altizer, J.T. Deahl, D.K. Monteith, R.K. Newton, D.E. Watson. Relationships between genomic, cell cycle, and mutagenic responses of TK6 cells exposed to DNA damaging chemicals, *Mutat. Res.* 578 (2005) 100–116.
- [26] D.M.S. Spencer, R.A. Bilardi, T.H. Koch, G.C. Post, J.W. Nafie, K.-I. Kimura, S.M. Cutts, D.R. Phillips. DNA repair in response to anthracycline–DNA adducts: A role for both homologous recombination and nucleotide excision repair, *Mutat. Res.* 638 (2008) 110-121.
- [27] Y.A. Amara-Mokrane, M.P. Lebucher-Michel, G. Balansard, G. Duménil, A. Botta. Protective effects of a-hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes, *Mutagenesis* 11 (1996) 161-167.
- [28] L.M.G. Antunes, C.S. Takahashi. Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells, *Mutat. Res.* 419 (1998) 137-143.

- [29] J.M. Gentile, S. Rahimi, J. Zwiesler, G.J. Gentile, L.R. Ferguson. Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumor agents, *Mutat. Res.* 402 (1998) 289-298.
- [30] L.M.G. Antunes, R.B.L. Bueno, F.L. Dias, M.L.P. Bianchi. Acetylsalicylic acid exhibits anticlastogenic effects on cultured human lymphocytes exposed to doxorubicin, *Mutat. Res.* 626 (2007) 155-161.
- [31] W.F. Costa, J.C. Nepomuceno. 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 (2006) 18-24.
- [32] D.C. Tavares, G.R.M. Barcelos, L.F. Silva, C.C.C. Tonin, J.K. Bastos. Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells, *Toxicol. In Vitro* 20 (2006) 1154–1158.
- [33] E.J. Fragiorge, M.A. Spanó, L.M.G. Antunes. Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*, *Genet. Mol. Biol.* 30 (2007) 449–455.
- [34] B.L.B. Valadares, U. Graf, M.A. Spanó. Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*, *Food Chem. Toxicol.* (2007) *in press*.
- [35] U. Graf, M.A. Spanó, J. Guzmán-Rincón, S.K. Abraham, H.H.R. Andrade. 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 of antigenotoxicity, *Afr. Newslett. Occup. Health Safet.* 6 (1996) 9–13.
- [36] D. Dapkus, D.J. Merrel. Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*, *Genetics* 87 (1977) 685–697.
- [37] I. Hällström, A. Blanck. 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 (1985) 157–171.
- [38] C. Saner, B. Weibel, F.E. Würigler, C. Sengstag. Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ. Mol. Mutagen.* 27 (1996) 46-58.

- [39] U. Graf, F.E. Würigler, A.J. Katz, H. Frei, H. Juon, C.B. Hall, P.G. Kale. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environ. Mutagen. 6 (1984) 153–188.
- [40] U. Graf, H. Frei, A. Kägi, A.J. Katz, F.E. Würigler. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test, Mutat. Res. 222 (1989) 359–373.
- [41] U. Graf, N. van Schaik. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, Mutat. Res. 271 (1992) 59-67.
- [42] J. Guzmán-Rincón, U. Graf. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: F.M. Butterworth, L.D. Corkum and J. Guzmán-Rincón (Eds.), *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, Plenum Press, New York, 1995, pp. 169–181.
- [43] H. Frei, F.E. Würigler. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*, Mutat. Res. 334 (1995) 247-258.
- [44] M.A. Kastenbaum, K.O. Bowman. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, Mutat. Res. 9 (1970) 527-549.
- [45] H. Frei, F.E. Würigler. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result, Mutat. Res. 203 (1988) 297–308.
- [46] J.H. Santos, U. Graf, M.L. Reguly, H.H.R. Andrade. The synergistic effects of vanillin on recombination predominate over its antimutagenic action in relation to MMC-induced lesions in somatic cells of *Drosophila melanogaster*, Mutat. Res. 444 (1999) 355–365.
- [47] M. Sinigaglia, M.L. Reguly H.H.R. Andrade. Effect of vanillin on toxicant-induced mutation and mitotic recombination in proliferating somatic cells of *Drosophila melanogaster*, Environ. Mol. Mutagen. 44 (2004) 394-400.
- [48] S.K. Abraham. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination, Mutagenesis 9 (1994) 383–386.
- [49] M.A. Spanó, H. Frei, F.E. Würigler, U.Graf. Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test, Mutagenesis 16 (2001) 385-394.

- [50] T. Takahashi, Y. Yokoo, T. Inoue, A. Ishii. Toxicological studies on procyanidin B-2 for external application as a hair growing agent, *Food Chem. Toxicol.* 37 (1999) 545-552.
- [51] E.C. Friedberg, G.C. Walker, W. Siede, DNA repair and mutagenesis, ASM Press, Washington, DC, 1995, p.698.
- [52] B.C. Baguley, L.R. Ferguson. Mutagenic properties of topoisomerase-targeted drugs. *Biochim. Biophys. Acta.* 1400 (1998) 213-222.
- [53] N.R. Bachur, S.L. Gordon, M.V. Gee. A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals, *Cancer Res.* 38 (1978) 1745-1750.
- [54] D. Bagchi, S.D. Ray, D. Patel, M. Bagchi, Protection against drug- and chemical-induced multiorgan toxicity by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract, *Drugs Exp. Clin. Res.* 27 (2001) 3–15.
- [55] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncola, M. Izakovic, M. Mazura, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.* 160 (2006) 1-40.
- [56] M.A. Soobrattee, V.S. Neergheen, A. Luximon-Ramma, O.I. Aruoma, T. Bahorun. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions, *Mutat. Res.* 579 (2005) 200-213.
- [57] H. Frei, F.E. Würzler, H. Juon, C.B. Hall, U. Graf. Aristolochic acid is mutagenic and recombinogenic in *Drosophila* genotoxicity tests, *Arch Toxicol.* 56 (1985) 158-166.
- [58] M. Lehmann, A. Franco, K.S.P. Vilar, M.L. Reguly, H.H.R. Andrade. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*, *Mutat. Res.* (2003) 539 167-175.
- [59] F. Cortés-Ledesma, C. Tous, A. Aguilera. Different genetic requirements for repair of replication-born double-strand breaks by sister-chromatid recombination and break-induced replication, *Nucleic Acids Res.* 19 (2007) 6560–6570.
- [60] J. Cairns. The origin of human cancers, *Nature.* 289 (1981) 353-357.
- [61] A.J.R. Bishop, R.H. Schiestl. Homologous recombination and its role in carcinogenesis, *J. Biomed. Biotechnol.* 2 (2002) 75–85.

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 cross (ST) after chronic treatment of larvae with grape seeds proanthocyanidins (GSPs) and doxorubicin (DOX)

Genotypes and treatments		Number of flies (N)	Spots 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 (%)
DOX (mg/mL)	GSPs (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	0.45 (27)	0.00 (00)	0.07 (04)	0.52 (31)	31	1.05			
0	1.680	60	0.52 (31)-	0.03 (02)i	0.07 (04)i	0.62 (37)-	37	1.26	0.21		
0	3.375	60	0.47 (28)-	0.12 (07)+	0.08 (05)i	0.67 (40)-	40	1.36	0.31		
0	6.750	60	0.43 (26)-	0.12 (07)+	0.08 (05)i	0.63 (38)-	38	1.29	0.24		
0.125	0	60	0.97 (58)+	2.20 (132)+	2.83 (170)+	5.43 (326)+	310	10.58	9.53	86.67	
0.125	1.680	60	0.77 (46)-	0.62 (37)+	0.53 (32)+	1.92 (115)+	109	3.72	2.67	52.43	
0.125	3.375	60	0.60 (36)+	0.45 (27)+	0.32 (19)+	1.37 (82)+	76	2.59	1.54	57.79	
0.125	6.750	60	0.57 (34)+	0.23 (14)+	0.12 (07)+	0.92 (55)+	55	1.87	0.82	50.00	
<i>mwh/TM3</i>											
0	0	60	0.22 (13)	0.02 (01)	-	0.23 (14)	14	0.47			
0.125	0	60	0.67 (40)+	0.18 (11)+	-	0.85 (51)+	51	1.74	1.27		
0.125	1.680	60	0.70 (42)-	0.15 (09)i	-	0.85 (51)-	51	1.74	1.27		
0.125	3.375	60	0.50 (30)i	0.05 (03)+	-	0.55 (33)+	33	1.12	0.65		
0.125	6.750	60	0.40 (24)+	0.03 (02)+	-	0.43 (26)+	26	0.88	0.41		

Marker-trans-heterozygous flies (*mwh/flr³*) and balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) were evaluated.

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würigler [1988; 1995]: -, negative; +, positive; i, inconclusive; P<0.05.

^bIncluding rare *flr³* single spots.

^cConsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

^dCalculated according to Frei et al. [1992].

^eNumber in square brackets are induction frequencies corrected for spontaneous incidence estimated from 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. 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 cross (HB) after chronic treatment of larvae with grape seeds proanthocyanidins (GSPs) and doxorubicin (DOX)

Genotypes and treatments		Number of flies (N)	Spots 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 (%)
DOX (mg/mL)	GSPs (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	0.42 (25)	0.07 (04)	0.07 (04)	0.55 (33)	33	1.12		
0	1.680	60	0.42 (25)-	0.05 (03)i	0.10 (06)i	0.57 (34)-	34	1.16	0.04	
0	3.375	60	0.50 (30)-	0.03 (02)i	0.00 (00)-	0.53 (32)-	32	1.09	-0.03	
0	6.750	60	0.47 (28)-	0.03 (02)i	0.02 (01)-	0.52 (31)-	31	1.05	-0.07	
0.125	0	60	1.22 (73)+	2.62 (157)+	5.08 (305)+	8.92 (535)+	519	17.72	16.60	89.69
0.125	1.680	60	1.08 (65)-	0.53 (32)+	0.43 (26)+	2.03 (122)+	115	3.92	2.80	43.92
0.125	3.375	60	0.62 (37)+	0.38 (23)+	0.30 (18)+	1.30 (78)+	76	2.59	1.47	37.41
0.125	6.750	60	0.42 (25)+	0.27 (16)+	0.28 (17)+	0.97 (58)+	58	1.98	0.86	24.41
<i>mwh/TM3</i>										
0	0	60	0.18 (11)	0.00 (0)	-	0.18 (11)	11	0.37		
0.125	0	60	0.57 (34)+	0.45 (27)+	-	1.02 (61)+	61	2.08	1.71	
0.125	1.680	60	0.73 (44)-	0.22 (13)+	-	0.95 (57)-	57	1.94	1.57	
0.125	3.375	60	0.57 (34)-	0.07 (04)+	-	0.63 (38)+	38	1.29	0.92	
0.125	6.750	60	0.50 (30)-	0.00 (0)+	-	0.50 (30)+	30	1.02	0.65	

Marker-trans-heterozygous flies (*mwh/flr³*) and balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) were evaluated.

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würzler [1988; 1995]: -, negative; +, positive; P<0.05.

^bIncluding rare *flr³* single spots.

^cConsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

^dCalculated according to Frei et al. [1992].

^eNumber in square brackets are induction frequencies corrected for spontaneous incidence estimated from 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.

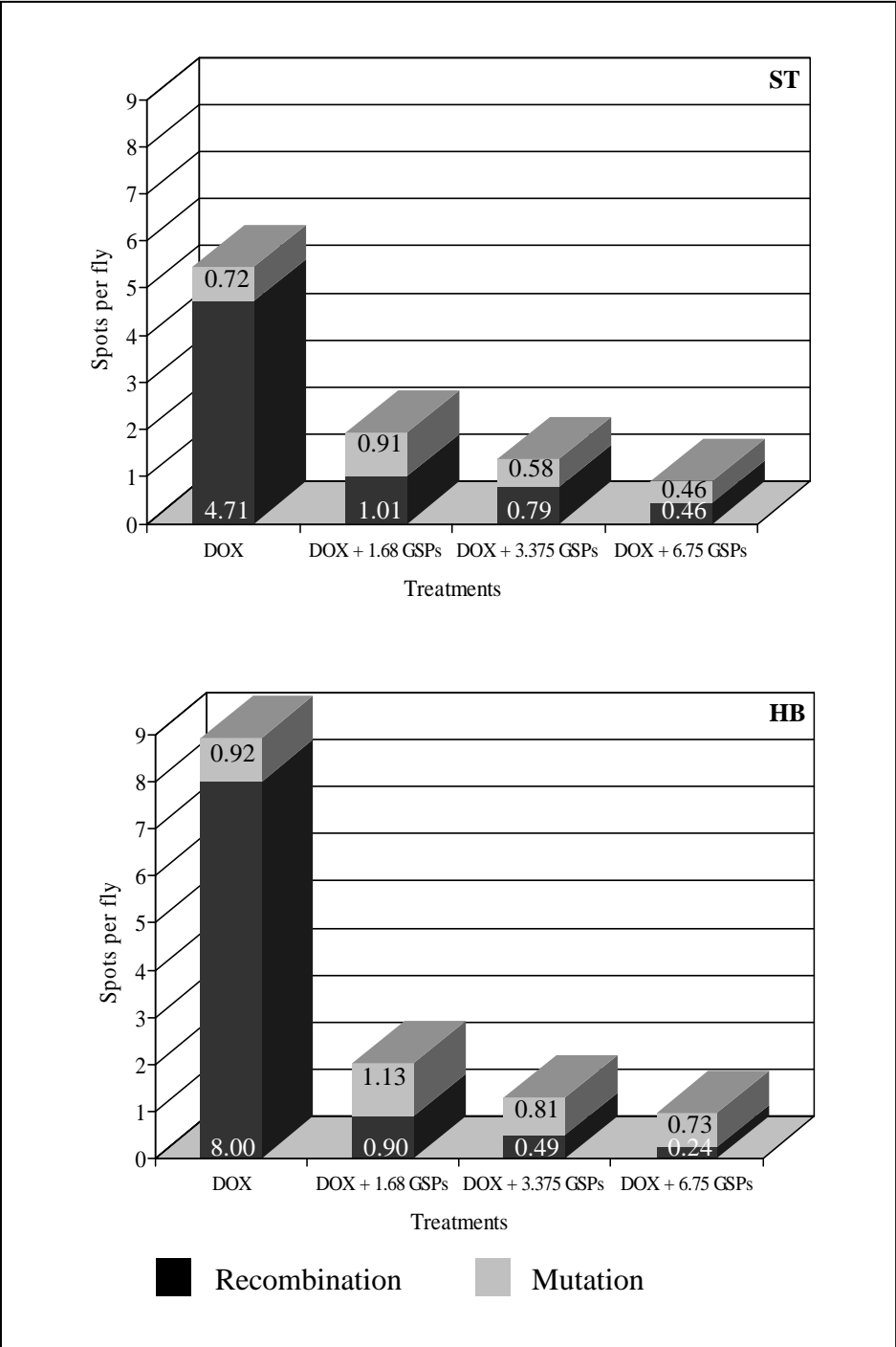


Figure 1. Contribution of recombination and mutation (in percentage) to total wing spot induction observed in MH individuals of the ST and HB crosses treated with DOX (0.125 mg/mL) alone and in association with different concentrations of GSPs (1.680; 3.375 or 6.750 mg/mL).