

Mutagenicity tests of the hair dye coupler 2-Methyl-5-N- β -hydroxyethylaminophenol in the yeasts (forward-mutations and gene conversions) and in the human cell line (uds assays).

N. LOPRIENO, G. BONCRISTIANI,
Istituto di Biochimica Biofisica e Genetica Università di Pisa (Italy).

Received: April 20, 1984

Key words: 2-methyl-5-N- β -hydroxyethylaminophenol, *S.pombe*, *S.cerevisiae*, HeLa Cells-negative.

Symposiis

2-Methyl-5-N- β -hydroxyethylaminophenol is a hair dye coupler ingredient. Its potential ability to induce gene mutations in the yeast *S. pombe*, mitotic gene conversion in the yeast *S. cerevisiae*, and unscheduled DNA synthesis in cultured human HeLa cells was evaluated.

The chemical proved unable to induce detectable genotoxic effects according to these tests.

The present paper reports the results obtained with short-term mutagenicity studies applied to 2-methyl-5-N- β -hydroxyethylaminophenol, a hair dye coupler (Fig. 1). Its mutagenic and genotoxic potential has been assessed with 2 widely used assays with yeasts (forward mutation assay and mitotic geneconversion assay) *S. pombe* (strain P1) and *S. cerevisiae* (strain D4) and with a test for the induction of unscheduled DNA synthesis (UDS) in human cell line (HeLa) (Loprieno et al., 1982, 1983).

Sommario

Il 2-metil-5-N- β -idrossietilamminofenolo è una sostanza compulante di tinture di capelli. È stata valutata la sua potenziale capacità di indurre mutazioni geniche nel lievito di *S. pombe*, la conversione genica mitotica nel lievito di *S. cerevisiae* e la sintesi di DNA non programmata in cellule umane coltivate del tipo HeLa.

In queste prove, la sostanza chimica ha mostrato di non essere in grado di indurre effetti genotossici rilevabili.

Il presente lavoro riferisce i risultati ottenuti negli studi di mutagenicità a breve termine condotti sul 2-metil-5-N- β -idrossietilamminofenolo, un copulante di tinture per capelli (Fig. 1). È stato determinato il suo potenziale mutagenico e genotossico per mezzo di due saggi largamente impiegati (prova di mutazione in avanti e di conversione genica mitotica) con i lieviti di *S. pombe* (ceppo P1) e di *S. cerevisiae* (ceppo D4) e con una prova per l'induzione della sintesi di DNA non programmata (unscheduled DNA synthe-

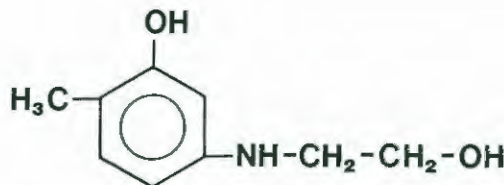


Fig.1: 2-Methyl-5-N- β -hydroxyethylaminophenol

Fig. 1: 2-Metil-5-N- β -idrossietilamminofenolo

According to a proposed sequential scheme of mutagenicity testing (Loprieno, 1982, 1983) there is a need for using eukaryotic mutagenicity assays to verify the results obtained with the Ames test: the verification assays may consist of a test for the induction of gene-mutation and one of or more tests for the induction of genotoxic effects.

The assays employed in the present analysis provide to fulfill these proposed requirements.

Materials and methods

Forward mutation assays with *Schizosaccharomyces pombe* were performed on strain SPade-60/rad10-198h-wich allows the detection of point mutations in 5 genetic loci of the adenine pathway: base-pair transition and transversion mutations, as well as base-pair insertion-deletion mutations, have been shown to be produced in this genetic system or in a similar system of the same yeast species.

In treatment with chemicals, cell suspension of the yeast cells (5×10^6 cells/ml) were incubated for 16 h in a shaking waterbath at 32°C. This treatment allow the yeast cells to undergo cell division, thus making the growing cells more sensitive to the test chemicals.

Mitotic gene conversion assays with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* were performed on strain D4 of the genotype α/a ; gal2/+; ade 2-2/ade2-1; trp5-12/trp5-27; leu1/+. This strain allows the detection of intragenic mitotic geneconversion events at the level of 2 loci, namely ade2 and trp5.

Yeast-cell suspensions were treated during growth, as in the *S. pombe* assay. Unscheduled DNA synthesis (UDS) test was performed on the HeLa human cell line obtained from a cervical carcinoma. The cells were exposed to the chemical

sis, UDS) in una linea di cellule umane (HeLa) (Loprieno et al., 1982, 1983).

Secondo una proposta di schema sequenziale di indagini sulla mutagenesi (Loprieno, 1982, 1983), si prospetta la necessità di impiegare saggi di mutagenicità eucariotica per verificare i risultati ottenuti con il test di Ames; i saggi di verifica possono consistere nella prova per l'induzione di mutazione genica e in una o più prove per l'induzione di effetti genotossici. I saggi impiegati nella presente analisi soddisfano questi requisiti così come sono stati proposti.

Materiali e metodi

I saggi di mutazione in avanti con lo *Schizosaccharomyces pombe* sono stati condotti sul ceppo SP ade-60/rad10-198h che consente l'identificazione delle mutazioni punto in 5 loci genetici del controllo della sintesi dell'adenina; si è dimostrato che le transizioni e transversioni di coppie di basi e le mutazioni per l'inserzione o delezione di coppie di basi vengono prodotte in questo sistema genetico o in un sistema simile dello stesso tipo di lievito.

Nel trattamento con le sostanze chimiche, le sospensioni cellulari delle cellule di lievito (5×10^6 cellule/ml) sono state incubate per 16 h a 32°C in un bagno ad acqua munito di agitatore. Questo trattamento consente la divisione cellulare delle cellule di lievito così da rendere quelle in crescita più sensibili alle sostanze chimiche di prova.

I saggi di conversione genica mitotica con il lievito di *Saccharomyces cerevisiae* sono stati condotti sul ceppo D4 dal genotipo α/a ; gal2/+; ade2-3/ade2-1; trp5-12/trp5-27 leu1/+. Questo ceppo consente di rilevare fenomeni di conversione intragenica mitotica al livello di 2 loci, cioè ade2 e trp5.

Come per il saggio con il *S. pombe*, le so-

for 1 h and the USD was evaluated by the incorporation of [^3H]TdR in hydroxyurea-treated cells. The [^3H]TdR was assessed by liquid scintillation counting in a Packard Tri-Carb spectrometer and by normal autoradiography, according to the method described by Abbondandolo et al.

Metabolic activation assays

All the methodologies described above were used with and without a metabolic activation system obtained from mammalian liver homogenate. In particular they were performed by using extracts of liver from CD-1 male rats treated with phenobarbital + β -naphthoflavone (Loprieno et al., 1982).

In all test the S9 fraction of the liver homogenate, with the addition of the required co-factors, was used.

Analysis of the results

All the data obtained from more than 1 experiment were treated by regression analysis, according to the equation $y = a + bx$ and the correlation factor was calculated for the evaluation of the statistical significance of the data. In some cases the simple x^2 test was applied in order to compare control and treated data.

Chemicals

2-Methyl-5-N- β -hydroxyethylaminophenol (Fig. 1), provided by l'Oreal, was a technical product purified by recrystallization.

The following chemicals were used as reference positive controls in the various mutational assays: N-nitrosodimethylamine (NDMA): hycanthone; methyl methanesulfonate; 2,4-Diaminoanisole 2 HCl.

spensioni cellulari di lievito sono state trattate durante la crescita.

La prova della sintesi di DNA non programmata (UDS) è stata realizzata su una coltura di cellule umane del tipo HeLa ottenute da un carcinoma cervicale. Le cellule sono state esposte per 1 ora alle sostanze chimiche e l'UDS è stato valutato dal [^3H]TdR incorporato nelle cellule trattate con idrossiurea. Secondo il metodo descritto da Abbondandolo et al., il [^3H]TdR è stato determinato per mezzo della conta in scintillazione liquida in uno spettrometro Packard Tri-Card e con una autoradiografia normale.

Saggi di attivazione metabolica

Tutte le metodologie sopra descritte sono state impiegate con e senza un sistema di attivazione metabolica ottenuto da omogenati di fegato di mammiferi. Questi, in particolare, sono stati realizzati usando estratti di fegato ottenuti da ratti maschi CD-1 trattati con fenobarbital + β -naftoflavone (Loprieno et al., 1982). In tutte le prove è stata utilizzata la frazione S9 dell'omogenato di fegato addizionata dei necessari co-fattori.

Analisi dei risultati

Tutti i dati ottenuti da più di un esperimento sono stati elaborati con l'analisi della regressione secondo l'equazione $y = a + bx$ ed il coefficiente di correlazione è stato calcolato dalla valutazione della significatività statistica dei dati. In alcuni casi è stato applicato il semplice criterio del x^2 al fine di confrontare i dati delle sostanze di controllo e di quelle trattate.

Sostanze chimiche

Il 2-metil-5-N- β -idrossietilamminofenolo (Fig. 1), fornito dall'Oreal, era un prodot-

Table I
Forward gene mutation assay of 2-Methyl-5-N- β -hydroxyethylaminophenol on *S. pombe* strain P1 with and without metabolic system.

Dose mM (x)	S-9 mix	Survival %	N° mutants N° colonies	Mut. frequency $\times 10^{-4}$ surv.
0	—	100	1/24,450	0.41
10	—	96	1/23,475	0.43
20	—	77	1/24,825	0.40
30	—	72	1/17,625	0.57
40	—	14	1/19,310	0.52
0	+	100	1/36,660	0.27
10	+	71	1/37,425	0.27
20	+	61	1/28,425	0.35
30	+	60	1/51,380	0.19
40	+	35	1/15,450	0.65

Regression analysis

— S-9 mix $y=0.3940+0.0036x$ $r=0.75861$ N.S.

+ S-9 mix $y=0.2100+0.0068x$ $r=0.60029$ N.S.

Results and discussion

Table I reports the results of the experiment performed with the chemical on the yeast *S. pombe* in the presence and absence of S9 mix: the regression analysis applied to the data showed data the compound has not been able to induce any statistically significant increase over the control value.

When tested in the same conditions 2,4-Diamminoanisole, in the absence of a metabolic system, and N-Nitrosodimethylamine, in the presence of a metabolic system, resulted positive (Table II).

Table III reports the results of the experiment performed with the chemical on the yeast *S. cerevisiae* in the presence and absence of S9 mix: the results proved to be negative for both loci investigated. Positive compounds were also tested in the same system (2,4-Diamminoanisole, and Hycanton) (Table IV).

The results of the UDS assays are reported in table V for 2-Methyl-5-N- β -hydroxyethylaminophenol and in table VI for the positive control, 2,4-Diamminoanisole.

to tecnico purificato per ricristallizzazione.

Come controlli positivi di riferimento per i diversi saggi mutazionali, sono state impiegate le seguenti sostanze chimiche: N-nitrosodimetilammina (NDMA), icantone, metil metansulfonato, 2,4-diamminoanisolo.2HCl.

Risultati e discussione

La Tavola I riporta i risultati dell'esperimento realizzato con la sostanza chimica in esame sul lievito di *S. pombe* sia in presenza che in assenza della miscela S9; l'analisi della regressione applicata ai dati ha mostrato che il composto non ha indotto alcun aumento statisticamente significativo rispetto al valore del controllo.

Il 2,4-diamminoanisolo, in assenza di un sistema metabolico e l'N-nitrosodimetilammina, in presenza di un sistema metabolico, sono risultati positivi nelle stesse condizioni di prova (Tavola II).

La Tavola III riporta i risultati dell'esperimento realizzato con la sostanza chimi-

Table II
Results of two positive compounds, namely 2, 4-Diaminoanisole and N-Nitrosodimethylamine tested on the *S. pombe* forward mutation assay

Chemical	Dose S-9 nM(x) mix	Survival %	N° mutants N° colonies	Mut frequency $\times 10^{-4}$ surv
2, 4-Diamino- anisole	0 —	100.0	2/20,418	0.98
	1.25 —	100.0	4/13,796	2.90
	2.50 —	87.9	8/11,976	6.68
	5.00 —	79.3	12/10,780	11.13
N-Nitroso- simethylamine	0 +	100.0	1/10,772	0.93
	0.5 +	100.0	14/13,464	10.40
	1.0 +	100.0	25/11,336	22.05
	10.0 +	100.0	105/10,500	100.00

Regression analysis

2,4-Diaminoanisole: $y = 0.8580 + 2.086x$ $r = 0.99391^{***}$

N-Nitrosodimethylamine: $y = 6.2011 + 0.4414x$ $r = 0.99433^{***}$

Table III
Mitotic gene conversion assay of 2-Methyl-5-N- β -hydroxyethylaminophenol on *S. cerevisiae* strain D4 with and without metabolic system

Dose mM(x)	S-9 mix	Survival %	Gene-conv.fre. $\times 10^{-5}$: <i>ade 2</i>	Gene-conv.fre. $\times 10^{-5}$: <i>trp 5</i>
0	—	100	0.76(38)	0.54(27)
10	—	77	1.49(57)	1.20(47)
20	—	78	1.38(54)	1.10(41)
40	—	66	1.88(62)	1.33(44)
0	+	100	0.60(25)	0.52(48)
10	+	100	0.95(52)	0.85(47)
20	+	53	1.10(53)	0.85(41)
40	+	88	0.44(36)	0.60(49)

Regression analysis

— S-9 mix *ade2*: $y = 0.5920 + 0.02431x$ $r = 0.89452$ NS

trp5: $y = 0.7580 + 0.0162x$ $r = 0.79787$ NS

+ S-9 mix *ade*: $y = 0.8720 - 0.00569x$ $r = -0.31837$ NS

trp: $y = 0.7020 + 0.00017x$ $r = 0.01716$ NS.

The results proved negative for the chemical under test and positive for the 2,4-Diaminoanisole on the basis of χ^2 analysis.

From these experiments, it may be concluded that 2-Methyl-5-N- β -hydroxyethylaminophenol does not produce gene mutation in the *S. pombe* yeast cells, it does not induce mitotic gene conversions in *S. cerevisiae* yeast cells and it does not

ca in esame sul lievito di *S. cerevisiae*, sia in presenza che in assenza della miscela S9; si sono avuti risultati negativi per ambedue i loci esaminati. Anche i controlli positivi (il 2,4-diaminoanisole e l'icantone) sono stati esaminati nello stesso sistema (Tavola IV).

I risultati del saggio dell'UDS per il 2-metil-5-N- β -idrossietilaminofenolo sono riportati nella Tavola 5 e nella Tavola

Table IV
Results of two positive compounds, namely 2, 4-Diaminoanisole and hycanton tested on the *S. cerevisiae* mitotic gene conversion assay

Chemical	Dose nM(x)	S-9 mix	Survival %	Gene-conversion fre x10 ⁻⁵	
				<i>ade 2</i>	<i>trp 5</i>
2,4 Diamino- anisole	0	—	100	0.67	0.67
	10	—	0.37	10.83	13.67
	15	—	0.06	54.90	52.94
	0	+	100	0.65	0.78
	10	+	2.13	5.52	7.87
	15	+	0.86	37.74	45.42
Hycanton	0	—	100	0.62	0.76
	0.05	—	88.9	15.63	14.24
	0.10	—	74.5	57.17	39.30
	0.20	—	29.3	260.00	317.54

Regression analysis

2,4-Diaminoanisole

— S-9 mix $ade2$ $y = -4.4725 + 0.24559x^2$ $r = 0.96039^*$ $trp5$ $y = -3.10389 + 0.23567x^2$ $r = 0.97625^*$ + S-9 mix $ade2$ $y = -3.6340 + 0.16865x^2$ $r = 0.94327$ NS $trp5$ $y = -3.9393 + 0.20304x^2$ $r = 0.95185^*$

Hycanton

 $ade2$ $y = -2.3171 + 6540.0x^2$ $r = 0.99440^{***}$ $trp5$ $y = -10.3489 + 8110.4x^2$ $r = 0.99185^{***}$

Table V
Results of the assay for the induction of the unscheduled DNA synthesis by 2-Methyl-5N- β -Hydroxyethylaminophenol on human Hela cell line

Dose mM	S-9 mix	n° grains/nucleus (mean T.S.D.)	
		— HU	+ HU
0	—	4.53 ± 2.03	1.56 ± 0.89
6	—	0.79 ± 0.58	2.21 ± 1.32
17	—	1.36 ± 0.50	4.68 ± 2.24
50	—	Toxic	Toxic
0	+	1.81 ± 1.05	1.24 ± 0.83
6	+	0.80 ± 0.42	1.50 ± 0.71
17	+	2.10 ± 1.18	2.96 ± 4.35
50	+	Toxic	Toxic

Table VI
Results of the assay for the induction of the unscheduled DNA synthesis
by a positive control chemical

Chemical	Dose mM	S-9 mix	N° grains/nucleus (means ± S.D.)	
			- HU	+ HU
2,4-Diamino- anisole	0	—	0,89 ± 0,83	0,90 ± 0,87
	1	—	6,11 ± 2,45	3,39 ± 0,99
	3	—	3,93 ± 0,96	2,86 ± 0,79
	10	—	> 50	< 50
	0	+	0,78 ± 0,80	0,64 ± 0,93
	1	+	2,00 ± 0,88	1,15 ± 0,82
	3	+	2,77 ± 1,07	1,54 ± 1,04
	10	+	4,07 ± 2,14	2,90 ± 0,75

2,4-Diaminoanisole has resulted positive for the induction of UDS in the absence of a metabolic activation system, on the basis of X^2 analysis.

stimulate UDS in the human HeLa cell line.

The present negative results obtained with three different short-term assays for testing the potential ability to produce different genotoxic effects together with other negative data reported by other AA. in this journal (Kalopissis, 1983, Shahin, et. al., 1983) allow the conclusion that 2-Methyl-5-N- β -hydroxyethylaminophenol does not represent a mutagenic risk in somatic cells.

6 sono riportati quelli del controllo positivo 2,4-diamminoisolo. Sulla base del criterio di x^2 , si sono avuti risultati negativi per la sostanza chimica in esame e positivi per il 2,4-diamminoisolo.

Da questi esperimenti si può concludere che il 2-metil-5-N- β -idrossietilamminofenolo non produce mutazioni geniche nelle cellule di lievito di *S. pombe*, non induce conversioni geniche mitotica nelle cellule di lievito di *S. cerevisiae* e non stimola l'UDS in una linea di cellule umane del tipo HeLa.

Questi risultati negativi ottenuti con tre differenti saggi a breve termine per la verifica della potenziale capacità di produrre differenti effetti genotossici, insieme ad ulteriori dati negativi riportati da altri AA. su questo argomento (Kalopissis, 1983, Shanin et al., 1983), consentono di concludere che il 2-metil-5-N- β -idrossietilamminofenolo non rappresenta un rischio mutagenico per le cellule somatiche.

Acknowledgments

This work was supported by SAIPO S.p.A. (contract n° 140/20.12.79) and CNR, Roma.

Ringraziamenti

Hanno contribuito al lavoro la SAIPO S.p.A. (contratto di ricerca n° 140/20.12.79) ed il Consiglio Nazionale delle Ricerche, Progetto finalizzato chimica fine e secondaria, Roma, Italia.

REFERENCES

1. **Loprieno, N. (1982):** «Mutagenic hazard and genetic risk evaluation on environmental, chemical substances». In: *Environmental Mutagens and Carcinogens*. T. Sugimura et al. (Eds.) Proc. 3rd Int. Conf. Environ. Mutagens. University of Tokyo Press, Tokyo/Liss, New York, 259-281.
2. **Loprieno, N. (1983):** «L'utilizzazione di alcuni sistemi genetici nello studio della potenzialità mutagena di composti chimici utilizzati nei coloranti dei capelli». Conferenza Tossicologia Cosmetici 173-203, Ets, Pisa.
3. **Loprieno, N. (1982):** «Mutagenic studies on the hair dye 2-(2',4'-diaminophenoxy) ethanol in the different genetic system». *Mutation Res.* **102** 331-346.
4. **Loprieno, N. (1983):** «Lack of genotoxic properties of the hair-dye component N-methyl-amino-2-nitro-4-N', N'-bis-(2-hydroxyethyl)-aminobenzene, in mammalian cells in vitro, and in yeasts». *Mutation Res.* **116** , 161-168.
5. **Kalopissis, G.** «Experimental Studies on a hairdyeing ingredient 2-methyl-5-N-beta-hydroxyethylaminophenol: lack of genotoxic properties». *Toxicol. Europ. Res.* (in press.).
6. **Shahin, M.M.:** «Mutagenicity test on the hair dye coupler 2-methyl-5-N- β -hydroxyethylaminophenol in Salmonella thphinurium/microsome plate assay and Saccharonyces cerevisiae strain D4». *Toxicol. Europ. Res.* (in press.).

