

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**Efeito Genotóxico dos Alcalóides β -Carbolínicos Harmano e Harmina em
dois Sistemas Eucariotos: na Levedura *Saccharomyces cerevisiae* e em
Fibroblastos de Pulmão de Hamster Chinês**

Jane Marlei Boeira

ORIENTADOR: Prof. Dr. João A. P. Henriques

**Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

Porto Alegre

2001

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Radiobiologia e no Laboratório de Genotoxicidade (GENOTOX) do Centro de Biotecnologia desta Universidade. O mesmo foi subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pelo GENOTOX.

“Nada detém um homem quando quer chegar lá.

**Os obstáculos que surgem servem apenas para aumentar sua capacidade de realização, e
o tornarem mais forte para alcançar o que quer que seja.”**

Eric Butterworth

DEDICATÓRIA

Dedico esta Tese ao meu pai e minha mãe

Que dedicaram a vida por mim...

E aos meus filhos, para que sirva de inspiração...

AGRADECIMENTOS

Ao Professor João Antonio Pêgas Henriques pela orientação, apoio, amizade e confiança durante todo este trabalho, tanto nos momentos felizes como nos mais difíceis desta trajetória. Sua amizade e compreensão demonstram a pessoa humana que é, muito obrigada por tudo.

Ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica, pela acolhida.

Ao Prof. Bernardo Erdtmann pela colaboração e ajuda durante o teste de aberrações e ensaio Cometa.

À Juliana da Silva, pela amizade, carinho, ajuda e cooperação com o ensaio Cometa, pelas dicas, pelas idéias...

Ao Prof. Martin Brendel, pela sua amizade, pelo incentivo, pelas discussões e por sua ajuda no inglês.

À Cristine Gaylarde e especialmente ao Prof. Eloy Garcia também pela ajuda no inglês.

À amiga Miriam Benicio da Fonseca por ter me ensinado tudo sobre as células de mamíferos (as V79), e ter acompanhado o início dos testes com estas células e me ensinado a técnica do teste de aberrações. Muito obrigada pela amizade e ajuda.

À Nusha, por ter me ensinado a técnica do ensaio Cometa, e principalmente pela amizade, e por ouvir meus muitos desabafos...

À Jaqueline Picada, pela ajuda com os testes finais com os mutantes *rads*, pelas valiosas discussões e por sua amizade.

Ao GENOTOX pelo apoio financeiro, e a todos os amigos e colegas deste Lab. pelo apoio, carinho e amizade. À Jaqueline da Silveira, pelo carinho, amizade e pela força nos momentos difíceis.

Aos professores e funcionários do Depto. de Biofísica pela acolhida, quando o nosso lab. foi dividido... Ao Sérgio Pinto, por sua amizade e disposição em ajudar sempre.

À todos os outros colegas de laboratório, cujos nomes não serão citados, por que são muitos e não há ordem de importância. A todos que souberam dar apoio nos momentos difíceis, me entenderam e vibraram juntos pelas conquistas. Obrigado pela amizade e carinho ao longo de todos estes anos.

Às minhas bolsistas de iniciação científica, Alice (hoje quase mestre), Maria, Márcia e Juliana Jung, pela ajuda valiosa nas diferentes fases deste trabalho. Ao bolsista de iniciação Renato pela espontaneidade, criatividade e pelas risadas...

Às secretárias Silvia e Márcia pela amizade e ajuda, que foram muitas, durante esta trajetória...

Aos funcionários e técnicos do nosso lab. que de modo tão prestativo sempre tornaram o nosso trabalho científico possível. À D. Maria também pelos muitos cafezinhos...

À todos aqueles que, direta ou indiretamente, torceram acreditaram e contribuíram para que eu chegasse até aqui. E são muitos...

À minha família, especialmente meu pai e minha mãe, que sempre acreditaram que eu era capaz, que me deram força e incentivo, durante todos os anos de minha vida. E aos meus filhos, sem os quais nada teria sentido...

À Deus, pela vida...

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
I – INTRODUÇÃO	1
1. ALCALÓIDES	1
1.1 Aspectos gerais	1
1.2 As β -carbolinas harmano e harmina	3
1.2.1 Biossíntese das beta-carbolinas	5
1.2.2 Principais propriedades de harmano e harmina	8
1.2.2.1 Propriedades químicas e físico-químicas	8
1.2.2.2 Propriedades farmacológicas	10
1.2.2.3 Interações com o DNA	12
2. ENSAIOS PARA DETECÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA EM EUCARIOTOS	16
2.1 Avaliação genotóxica	18
2.1.1 Testes de mutações reversa, conversão gênica e recombinação mitótica na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
2.1.2 Efeito citotóxico em células de <i>S. cerevisiae</i> deficientes em sistemas de reparo de DNA	21
2.2 Ensaio em cultura de células de mamíferos	24
2.2.1 Análise de aberrações cromossômicas	25

2.2.2 O Ensaio Cometa	29
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos	32
II – CAPÍTULO I	34
“Genotoxic and Recombinogenic Activities of the Two β -Carboline Alkaloids Harman and Harmine in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ”	
III - CAPÍTULO II	61
“Genotoxic Effects of the Alkaloids Harman and Harmine Assessed by Comet Assay and Chromosome Aberration Test in Mammalian Cells <i>in vitro</i> ”	
IV – DISCUSSÃO	88
4.1. Citotoxicidade na levedura e em culturas de células de mamíferos	89
4.2. Mutagênese e Recombinogênese em <i>S. cerevisiae</i>	90
4.3. Efeitos de harmano e harmina sobre linhagens de <i>S. cerevisiae</i> deficientes em sistemas de reparo	92
4.4. Aberrações cromossômicas	94
4.5. Ensaio Cometa	95
V – CONCLUSÕES	99
VI – PERSPECTIVAS	101
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

ÍNDICE DE FIGURAS

I. INTRODUÇÃO

Figura 1 – Estrutura geral dos alcalóides β -carbolínicos harmano e harmina	04
Figura 2 – Principais etapas da biossíntese dos alcalóides β -carbolínicos, em vegetais	06
Figura 3 – Reação de Pictet Spengler	07
Figura 4 – Equilíbrios de dissociação de harmano, no estado S_0	10
Figura 5 – Classificação das aberrações cromossômicas	28
Figura 6 - Visualização da imagem de uma célula "cometa"	30

II. CAPÍTULO I

Figure 1 – Nomenclature and structural formula of the harman and harmine alkaloids	39
Figure 2 – Sensibility to harmine and harman alkaloids of different <i>rad</i> mutants haploids strains	45

III. CAPÍTULO II

Figure 1 – Nomenclature and structural formula of the harman and harmine alkaloids	66
Figure 2 – Cell survival of V79 cells after exposure to harman and harmine for 3 h in absence of metabolization	70
Figure 3 – The distribution of damage classes (0 – undamaged to 4 – maximum damage) of V79 cells in the presence and absence of S9-mix after harman and harmine treatments at different concentrations	72

IV. DISCUSSÃO

Figura 7 - Compostos com estrutura tricíclica	91
--	----

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table I – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains used in this study	40
Table II – Induction of point mutation (<i>his1-7</i>), ochre allele (<i>lys1-1</i>) and frameshift (<i>hom3-10</i>) mutation in haploid XV185-14c strain of <i>S. cerevisiae</i> after harman and harmine treatments, during 20 h, in the stationary phase	47
Table III – Induction of point mutation (<i>his1-7</i>), ochre allele (<i>lys1-1</i>) and frameshift (<i>hom3-10</i>) mutation in haploid XV185-14c strain of <i>S. cerevisiae</i> after harman and harmine treatments, during 20 h, in the exponential phase	48
Table IV – Induction of crossing-over (<i>+ / cyh2</i>) and gene conversion (<i>leu1-1 / leu1-12</i>) in diploid XS2316 strain of <i>S. cerevisiae</i> after harman and harmine treatments, during 20 h, in exponential phase	49

CAPÍTULO II

Table 1 – Frequencies of chromosomal aberrations in V79 cells after 3 h treatment with harman and harmine, in absence of S9-mix	73
Table 2 – Effect of alkaloids harman and harmine in V79 cells exposed for 2 hours and evaluated by Comet assay in presence (+) and absence (-) of metabolic activation	74
Table 3 – Genotoxic effects of harman and harmine alkaloids	75

ABREVIATURAS

A	Adenina
^{14}C	Carbono 14
C	Citosina
CA	Aberrações cromossômicas (<i>chromosome aberrations</i>)
CAT	Catalase
CHO	Células de ovário de hamster Chinês (<i>Chinese hamster ovary cells</i>)
CP	Ciclofosfamida
CO_2	Dióxido de Carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DSBs	Quebras duplas no DNA (<i>double strand breaks</i>)
EC	Ensaio Cometa
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FBS	Soro bovino fetal
G	Guanina
GSH	Glutationa
^3H	Trítio
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosil-transferase
IMAO	Inibidores das monoamino-oxidases
LSD	Dietilamida do ácido lisérgico (<i>Lysergic acid diethylamide</i>)
LMA	Agarose de baixo ponto de fusão (<i>low melting</i>)
MAO-A	Enzima monoamino-oxidase tipo A
MEM	Meio mínimo essencial
MM	Meio mínimo (sem aminoácidos)
MMS	Metilmetanosulfonado
NADP	Fosfato dinucleotídeo adenina-nicotinamida

NER	Reparo por excisão de nucleotídeos (<i>nucleotide excision repair</i>)
4-NQO	Óxido de 4-nitroquinoleína
-OCH ₃	Radical metoxila
PBS	Tampão salina-fosfato
SC	Meio sintético completo
SC+cyh	Meio sintético completo suplementado com cicloeximida
SC-leu	Meio sintético sem leucina
SC-lys	Meio sintético sem lisina
SC-his	Meio sintético sem histidina
SC-hom	Meio sintético sem homoserina
SCE	Troca de cromátides irmãs (<i>sister chromatid exchange</i>)
SCGE	<i>Single cell gel eletroforesis</i> (ensaio Cometa)
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido-dismutase
T	Timina
U	Uracila
UV	Ultra-violeta
UVC	Ultra-violeta de 254 nm
YPD	Meio completo para leveduras
WT	Linhagem selvagem (<i>wild type</i>)

RESUMO

Harmano e harmina, dois alcalóides β -carbolínicos encontrados em várias famílias de plantas, são conhecidos, principalmente, por apresentarem ações sobre os sistemas nervoso central, muscular e cardiovascular, causando alucinações, tremores, convulsões, hipotensão e bradicardia. São também agentes intercalantes entre as bases do DNA e inibidores enzimáticos, como as DNA topoisomerasas e monoamino-oxidases.

No presente estudo, foi investigada a citotoxicidade e genotoxicidade de harmano e harmina, em dois sistemas eucariotos, na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e em culturas de fibroblastos de pulmão de hamster Chinês, células V79. Estes alcalóides apresentaram uma importante citotoxicidade em *S. cerevisiae* e em células V79, sendo este efeito mais pronunciado para a harmina. Na levedura, os dois alcalóides induziram resposta mutagênica fraca em células haplóides da levedura tratadas em fase exponencial na ausência de crescimento, para os locus *his1-7* (mutação *missense*), *lys1-1* (mutação *forward*) e *hom3-10* (mutação *frameshift*). Harmano e harmina aumentaram as frequências de recombinação (conversão gênica e crossing-over) em células diplóides apenas em condições de crescimento, porém somente para harmina estes resultados foram significantes. A sensibilidade pronunciada dos mutantes *rad6* Δ (defectivo na via mutagênica) e *rad52-1* (deficiente em recombinação) ao harmano e harmina, permitiram inferir que estes alcalóides induzem, direta ou indiretamente, quebras simples e duplas nas cadeias de DNA. Já a sensibilidade mostrada pelos mutantes defectivos nas vias de reparação por excisão-ressíntese (*rad3-e5*, *rad1* Δ) aos alcalóides, indicaram que os mesmos também podem produzir adutos no DNA.

As análises das interações entre os diferentes mutantes *rad* de *S. cerevisiae*, defectivos nas três principais vias de reparação, em relação aos danos no DNA produzidos por harmano e harmina, mostraram uma interação do tipo epistática entre os alelos mutantes *rad3-e5* e *rad52-1*. Estes resultados sugerem que as lesões provocadas por esses alcalóides necessitam, para serem reparadas, da ação conjunta dos mecanismos de reparação por excisão-ressíntese e por recombinação. Entretanto, a interação não epistática observada entre os mutantes *rad1Δ* e *rad6Δ* indica que ambas as vias de reparação por excisão-ressíntese e sujeita à erros, atuam independentemente no reparo das lesões induzidas por estes alcalóides.

Nas células V79, harmano e harmina usados em diferentes doses, induziram um aumento nas frequências de aberrações, embora eles não tenham mostrado um claro efeito dose-resposta. Estes resultados indicaram que os dois compostos são agentes clastogênicos fracos. No ensaio Cometa, estes alcalóides apresentaram os índices e as frequências de danos sobre o DNA significativamente aumentados em relação ao controle, em presença e ausência de um sistema de ativação metabólica. Estes resultados reforçam aqueles obtidos com as células de *S. cerevisiae* de que o harmano e a harmina geram quebras de cadeias simples e duplas no DNA.

ABSTRACT

Harman and harmine, two β -carboline alkaloids found in a number of plant families, are especially known for their action on the central nervous system (CNS), muscular and cardiovascular systems, causing hallucination, tremor, convulsion, hypo-tension and bradycardia. They are also intercalating agents between DNA and enzymatic inhibitors, like DNA topoisomerases and monoamino-oxydases.

The cytotoxicity and genotoxicity of these alkaloids were studied in two eukaryotic systems, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and in Chinese hamster lung fibroblasts, V79 cells. An important degree of cytotoxicity was observed in both systems, more pronounced, however for harmine. In yeast a weak mutagenic response was observed for haploid cells when treated in the exponential growth phase, in the absence of growing, for the loci *his1-7* (*missense* mutation), *lys1-1* (*forward* mutation) and *hom3-10* (*frameshift* mutation). Harman and harmine increased their recombinogenic frequencies (gene conversion and crossingover) in diploid cells only in growing conditions. However, only for harmine significant results were found. The pronounced sensitivity of *rad6 Δ* (defective in the mutagenic pathway) and *rad52-1* (recombination deficient) to harman and harmine indicate that these alkaloids can, directly or indirectly, induce single and double DNA strand breaks. Mutants defective in the excision-resynthesis repair pathway (*rad3-e5* and *rad1 Δ*) show sensitivity to the alkaloids, indicating that, in addition, they can induce DNA adducts.

The analysis of the interactions between the different *rad* mutants of *S. cerevisiae*, defective in the three main repair pathways, concerning DNA damage caused by harman and

harmine, show an epistatic type interaction between mutant alleles *rad3-e5* and *rad52-1*. These results suggest that the lesions caused by these alkaloids, to be repaired, need the concurring action of excision-resynthesis and recombination mechanisms. However, the non-epistatic interaction observed between *rad1Δ* and *rad6Δ* mutants indicate that both excision-resynthesis and error prone repair pathways act in the repair of lesions induced by these alkaloids in an independent fashion.

Though not showing a clear dose-response effect on V79 cells, different doses of harman and harmine induce an increase in the aberration frequency. This is an indication that both compounds are weak clastogenic agents. In the Comet assay, in the presence and in the absence of a metabolic activation system, an increase of indices and frequencies DNA damage over the results of the control was shown. The above confirm and reinforce previous results in *S. cerevisiae* cells indicating that harman and harmine cause single and double DNA strand breaks.

I - INTRODUÇÃO

1. ALCALÓIDES

1.1 Aspectos gerais

Desde os primórdios da civilização têm-se utilizado extratos vegetais contendo alcalóides como medicamentos, como venenos e em poções mágicas. Como exemplo, pode-se citar o emprego de certas plantas utilizadas para execuções na Grécia Antiga e no Império Romano. O filósofo grego Sócrates foi executado através da ingestão de uma bebida preparada a base de "cicuta" contendo o alcalóide coniina. No Império Romano, Lívia, a esposa do Imperador Augusto, eliminava seus inimigos assassinando-os em banquetes nos quais usava secretamente a beladona, fonte do alcalóide atropina.

A primeira definição destas substâncias se deve à Pelletier em 1818 que as descreve como um grupo de compostos básicos, nitrogenados e de origem vegetal, sendo que alcalóides "verdadeiros" seriam compostos que seguiriam as seguintes especificações: o átomo de nitrogênio (N) faria parte do sistema heterocíclico, o composto teria caráter básico e uma estrutura molecular complexa, apresentando atividade farmacológica e restrito ao reino vegetal. Atualmente, esta definição está em desuso, pois já se conhecem substâncias consideradas alcalóides nas quais o N não faz parte do sistema heterocíclico (mescalina) e outros que não apresentam caráter básico (capsaicina). Sabe-se também que os alcalóides não são restritos ao reino vegetal. Várias substâncias com estrutura clássica de alcalóides têm sido isoladas de animais e de bactérias.

Atualmente, alcalóides são compostos nitrogenados que possuem uma ou mais moléculas de carbono. Alguns alcalóides apresentam uma estrutura simples, contendo apenas um anel (monocíclicos), enquanto outros possuem uma estrutura complexa com vários anéis (policíclicos). Mais de 100.000 estruturas químicas de alcalóides são conhecidas. O grupo amino usualmente define suas propriedades químicas, tais como toxicidade e outras atividades farmacológicas importantes (Costa 1993; Henriques *et al.* 1999).

Em geral, cerca de 20 a 40% das plantas possuem algum tipo de alcalóide. Encontram-se principalmente nas Dicotiledôneas e em algumas Monocotiledôneas, sendo pouco freqüentes nas Gimnospermas e Pteridófitas. Distribuem-se, em cada espécie, por toda a planta mas tendem a acumular-se em certas regiões, em particular nos tecidos externos, no tegumento das sementes e nas cascas dos caules e raízes. Geralmente a raiz apresenta a maior concentração de alcalóides (Costa 1993). Com relação à localização intracelular, estes compostos são sintetizados no retículo endoplasmático, concentrando-se nos vacúolos. Nos tecidos secos, aparecem impregnando as paredes celulares (Costa 1993).

Várias substâncias com estrutura clássica de alcalóides também têm sido isoladas de outros organismos, como em alguns gêneros de fungos (psilocina, em *Psilocybe sp.*), em bactérias (piocianina, em *Pseudomonas aeruginosa*) e em mamíferos (Bruneton 1991; Hashimoto e Yamada 1994).

Os alcalóides são substâncias de grande interesse para os pesquisadores devido aos seus efeitos farmacológicos. Na medicina, o interesse por essas substâncias levou à descoberta de alcalóides clinicamente apropriados para o tratamento de câncer, tais como vimblastina e vincristina, extraídos da *Vinca rosea* (Krommer e Szalai 1992; Dine *et al.*

1995; Culmsee *et al.* 2001). Um outro exemplo, a berberina, é bastante conhecida por suas atividades antimicrobiana e antitumoral, e por sua ação nos sistemas cardiovascular, respiratório e digestivo (Pasqual *et al.* 1993; Iwasa *et al.* 2000; Cordell *et al.* 2001). O LSD (*Lysergic acid diethylamide*) e a cocaína são também alcalóides conhecidos devido aos seus efeitos alucinógenos e à dependência que induzem em seus usuários (Abraham e Manem 1996). Portanto, muitos alcalóides são utilizados na terapêutica, puros ou em associação, e também na forma de derivados. Muitos são empregados como matéria-prima para a síntese de fármacos. Entre outras atividades farmacológicas incluem-se: atividades analgésica (morfina), antidiurética (ajmalicina), hipotensiva (reserpina, ioimbina), alucinogênica (mescalina), antimalárica (quinina), antitussígena (codeína e noscapina), miorrelaxante (tubocurarina), e outras (Pelletier 1983; Bruneton 1991; Henriques *et al.* 1999; Cordell *et al.* 2001).

1.2 As β -carbolinas harmano e harmina

As primeiras β -carbolinas descobertas foram a harmalina, em 1837 por Gobel, e a harmina, em 1847 por Fritsche, ambas a partir das sementes de *Peganum harmala* (Zygophillaceae), uma planta que no passado era utilizada por nativos da Ásia em rituais religiosos devido à sua ação alucinogênica (Hashimoto *et al.* 1988; Grella *et al.* 1998; Rommelspacher *et al.* 2000). As β -carbolinas são, por isso, conhecidas como alcalóides do harmala. Outros derivados foram descobertos sendo que, os mais conhecidos são harmina, harmol, harmalol, harmano, harmalina e norharmano (Allen e Holmstedt 1980).

Harmano e harmina são, portanto, alcalóides que pertencem ao grupo das β -carbolinas, forma insaturada, que além de apresentarem em sua estrutura um núcleo indólico, possuem um anel piridínico (Figura 1; para revisão ver, Bruneton 1991; Henriques *et al.* 1999).

Estes compostos possuem uma distribuição bastante diversificada, sendo encontrados em várias famílias de plantas, como exemplos: Apocynaceae, Elaeagnaceae, Leguminosae, Malpighiaceae, Passifloraceae, Zygophyllaceae (Allen e Holmstedt 1980; Henriques *et al.* 1999). A casca e a folha de *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae), uma planta da América do Sul que contém harmina, são utilizadas na preparação de uma bebida conhecida como ayahuasca (yagé, hoasca, daime ou caapi). Esta bebida é obtida a partir da fervura destas partes da planta junto com as folhas de *Psychotria viridis*, que contém triptaminas, resultando em um potente alucinógeno utilizado em rituais religiosos no Brasil, Bolívia, Equador e Peru (Callaway *et al.* 1996, 1999; Freedland e Mansbach 1999).

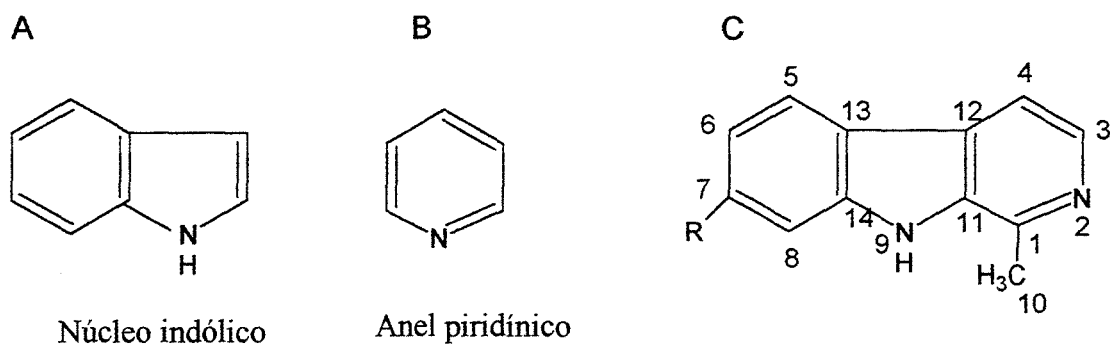


Figura 1 - Estrutura geral dos alcalóides β -carbolínicos harmano e harmina.

A) Núcleo indólico;

B) Anel piridínico;

C) R = H

R = OCH₃

Harmano (1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol)

Harmina (7-metoxi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol)

Outra planta muito utilizada para a extração destes alcalóides, principalmente de harmano, é a *Passiflora incarnata* (Passifloraceae) conhecida como maracujá. Possui ação sedativa e antiespasmódica e é utilizada nas neurastenias, nas neuroses devidas à excesso de trabalho, nas perturbações nervosas da menopausa, nas nevralgias, nas insônias e na histeria (Allen e Holmstedt 1980; Costa 1993). Ainda hoje esta planta é muito utilizada para a preparação de medicamentos para estas finalidades (como exemplos: Maracugina ®, Passiflorine ®, Serenus ®).

Harmano também é encontrado na fumaça do cigarro, no tabaco, em alimentos protéicos excessivamente cozidos, em carnes e peixes grelhados e em bebidas alcoólicas, como vinho, cerveja, saqué e uísque (Felton e Knize 1990; Gross *et al.* 1993; Herderich e Gutsche 1997; Totsuka *et al.* 1999). Este alcalóide também foi identificado nos mamíferos, inclusive no homem, localizando-se em diferentes líquidos biológicos e tecidos, como na urina, nas plaquetas, no plasma, no soro, no leite, no cérebro, no cristalino e no fígado (Kuhn *et al.* 1995; Meester 1995; Zheng *et al.* 2000), tanto pelo acúmulo, proveniente da alimentação, como por síntese endógena.

1.2.1 Biossíntese das beta-carbolinas

Nos vegetais, as β -carbolinas originam-se do aminoácido triptofano através da condensação de Mannich entre a triptamina (produto de descarboxilação do triptofano) e um aldeído ou α -cetoácido, como demonstrado por estudos utilizando marcação isotópica com Carbono-14 (^{14}C) e Trítio (^3H) (Husson 1985).

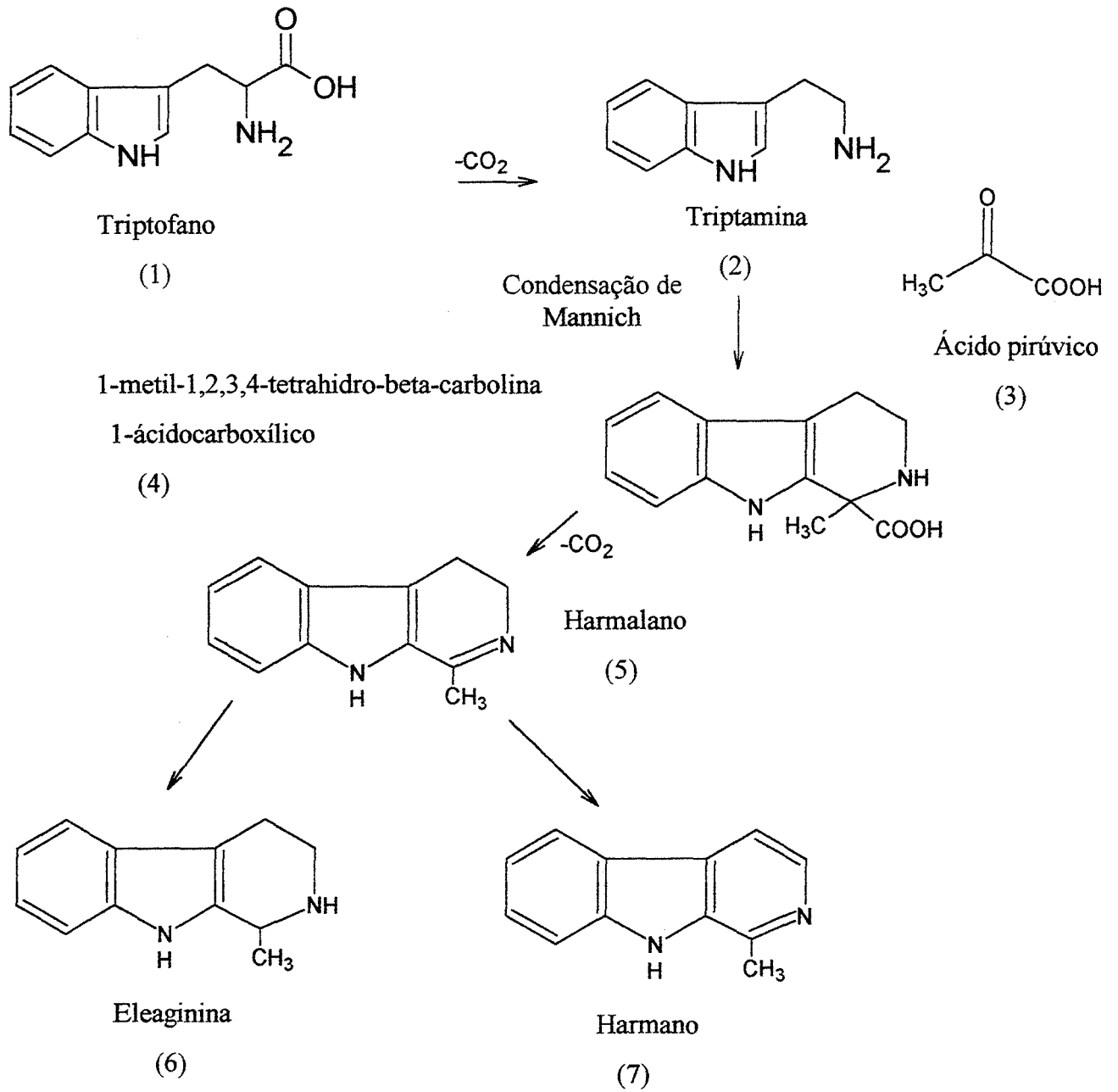


Figura 2 – Principais etapas da biossíntese dos alcalóides β -carbolínicos em vegetais

(Husson 1985)

Como mostra a Figura 2, os alcalóides β -carbolínicos eleaginina (tetraidro-harmano) e harmano foram biossintetizados a partir do triptofano-3'- ^{14}C em *Eleagnus angustifolia* e *Passiflora edulis*, respectivamente. Através da condensação da triptamina, o ácido pirúvico fornece os dois átomos de carbono que faltam para a formação do núcleo β -carbolina, gerando o intermediário 1-metil-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolina-1-ácido carboxílico. Este aminoácido marcado no anel benzênico com ^3H e no grupo metila com ^{14}C , mostrou ser o melhor precursor para eleaginina e harmano. Harmalano, produto de descarboxilação do aminoácido, foi incorporado em ambos os alcalóides (Husson 1985).

Nos mamíferos, pesquisadores acreditam que as β -carbolinas sejam formadas endogenamente pela reação de Pictet-Spengler, na qual um componente carbonil (formaldeído ou acetaldeído) é condensado com uma indolamina (triptamina, 5-hidroxitriptamina, 5-metoxitriptamina, N-metiltriptamina, etc.), reação análoga à observada nos vegetais (Figura 3) (para revisão ver, Ducrot *et al.* 2000). A partir desta condensação forma-se o 1-metila-1-carbóxi-tetraidro- β -carbolina que é posteriormente metabolizado pela hidroxilação do anel (nas posições -5, -6 e -7), descarboxilado, metilado e desidrogenado formando os compostos da família das β -carbolinas (Ducrot *et al.* 2000).

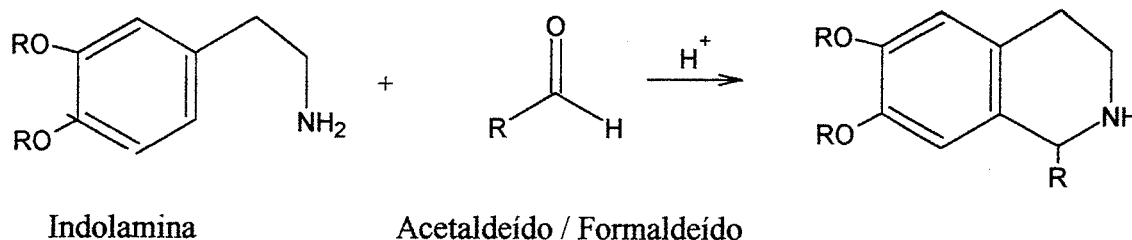


Figura 3 – Reação de Pictet-Spengler

Evidências da formação endógena de harmano nos mamíferos após a ingestão de álcool também foram demonstradas. Harmano seria sintetizado como produto da condensação do acetaldeído, derivado da oxidação do etanol, com as aminas (catecolaminas) endógenas (adrenalina, noradrenalina e dopamina). Esta reação foi demonstrada em homogenatos de cérebro humano e de roedores e também no sangue humano (Barker *et al.* 1981; Collins 1983; Rommelspacher *et al.* 1984, 1996). Harmano também foi encontrado na urina humana e de ratos após a ingestão de álcool (Rommelspacher *et al.* 1984, 1996).

Alguns autores sugerem também que estas β -carbolinas e seus derivados formados endogenamente seriam responsáveis por alguns efeitos farmacológicos e a dependência ao álcool (Rommelspacher *et al.* 1996; Wodarz *et al.* 1996; Murray e Berger 1997).

1.2.2 Principais propriedades de harmano e harmina

1.2.2.1 Propriedades químicas e físico-químicas

Os alcalóides harmano e harmina são estruturalmente constituídos pelo anel tricíclico pirido (3,4-b) indol: anel piridínico aromático (sistema beta-carbolina). Harmina difere do harmano somente pela presença de uma metoxila (-OCH₃) no carbono-7 (Figura 1).

Harmano (C₁₂H₁₀N₂) possui ponto de fusão entre 237 e 238°C, enquanto que para harmina (C₁₃H₁₂ON₂), o ponto de fusão fica em torno de 257 e 259 °C. Ambos exibem forte fluorescência em luz visível e em ultra-violeta (UV; Richardson e Gangolli 1994).

O alcalóide harmano foi analisado tridimensionalmente por difração de raio-X por Hardiman *et al.* (1987). Esta análise forneceu dados sobre a estrutura deste alcalóide, mostrando que os três anéis que compõem a β -carbolina aromática são planares entre si. Somente os átomos de H do grupo metila apresentam-se projetados apreciavelmente do plano molecular.

A estrutura β -carbolina apresenta dois pontos chaves para o estudo dos equilíbrios de dissociação em soluções aquosas: o grupo NH, fracamente ácido do anel indólico, e o átomo de N básico do anel piridínico (Figura 1). Estes grupos favorecem também a formação de pontes de hidrogênio intermoleculares, entre estruturas idênticas ou diferentes.

Harmano e harmina, em soluções aquosas, dependendo do pH, existem em pelo menos três espécies carregadas diferentemente (catiônica, neutra e aniônica) identificadas (no estado fundamental S_0) por espectros de absorção (Figura 4) Já os espectros de fluorescência acusam uma quarta espécie, a anfotérica, resultante da fotoexcitação para o estado S_1 (Reymon *et al.* 1999). De acordo com o espectro de absorção do alcalóide harmano, a espécie catiônica está presente entre pH 1-6, enquanto que a molécula neutra, entre 8-13. Entre pH 7-8, harmano apresenta-se totalmente protonado. A solubilidade das β -carbolinas harmano e harmina foram determinadas em pH 7 e 13 a 20°C, observando-se que a solubilidade destes compostos aumenta com a diminuição do pH (forma catiônica; Burrows *et al.* 1996).

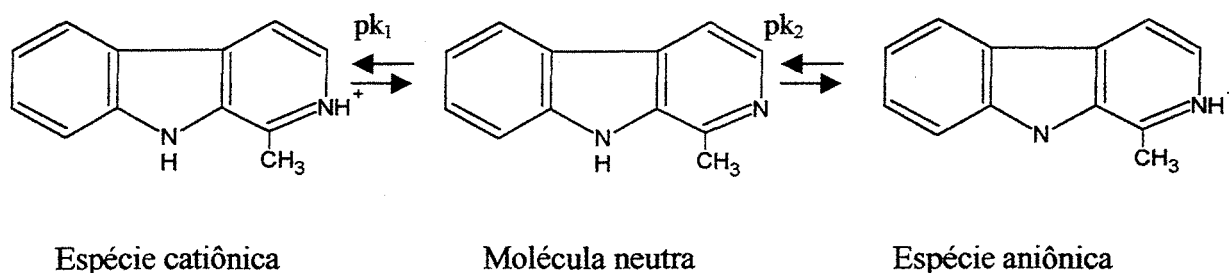


Figura 4 – Equilíbrios de dissociação de harmano, no estado S₀.

1.2.2.2 Propriedades farmacológicas

Diversos efeitos farmacológicos são relacionados com estes alcalóides, principalmente sobre os sistemas nervoso central (SNC), muscular e cardiovascular em animais e no homem.

A administração de harmina induz excitação, tremores e ataxia em gatos, macacos, coelhos e camundongos (Fuentes e Longo 1971; Meert 1994). Harmano induz alterações comportamentais em humanos, incluindo alucinações, excitação e euforia. Em altas doses, harmano causa uma síndrome caracterizada por tremores e convulsões. Em animais, harmano também produz depressão locomotora, tremores e convulsões (Ergene e Schoener 1993).

O mecanismo de ação de harmano e harmina sobre o SNC está relacionado com a inibição da enzima monoamino-oxidase tipo A - MAO A (Rommelspacher *et al.* 1994; Kim *et al.* 1997). As enzimas MAO encontram-se na membrana externa das mitocôndrias, cuja localização normalmente “protege” as monoaminas endógenas contra a sua ação oxidativa,

mantendo os respectivos teores teciduais dentro de limites fisiológicos. Devido à isto, a administração de inibidores da MAO (IMAO) acarreta aumento dos depósitos destas aminas (principalmente da dopamina, noradrenalina e serotonina) no cérebro. Conseqüência deste efeito é um estado de excitação, euforia, aumento da atividade psicomotora (efeito antidepressivo), entre outros (Rang *et al.* 1997). A ingestão de alimentos ricos em aminas (tiramina) tais como queijos, cerveja, vinho, fígado de galinha, conservas, grandes quantidades de café, frutas cítricas e chocolate juntamente com os IMAO, intensifica o acúmulo das aminas biógenas tornando o indivíduo mais suscetível aos seus efeitos. Em adição, o efeito de algumas substâncias tais como anfetaminas, sedativos, anti-histamínicos, analgésicos potentes e anti-depressivos são prolongados na presença de IMAO (Rang *et al.* 1997).

Acredita-se que o efeito alucinógeno das β -carbolinas seja devido à inibição da MAO ou à similaridade estrutural dos mesmos com as aminas indólicas triptamina e serotonina (5-HT). Estes alcalóides, portanto, ligam-se à receptores de serotonina (5-HT₂ e 5-HT_{1A}), de forma similar ao LSD (Grella *et al.* 1998; Glennon *et al.* 2000), de maneira competitiva. Além disso, harmina também se liga à receptores dopaminérgicos (D₂) (Pimpinella e Palmery 1995; Glennon *et al.* 2000) e receptores benzodiazepínicos (Glennon *et al.* 2000).

Outros efeitos com estes alcalóides também foram observados. A administração intravenosa de harmina causou bradicardia e hipotensão em gatos, cães, ratos e seres humanos; os gatos apresentaram ainda apnéia e arritmias ventriculares (Slotkin e Distefano

1970; Aarons *et al.* 1977). Recentemente, harmano também causou hipotensão e bradicardia em ratos (Shi *et al.* 2000).

Outras propriedades interessantes também foram observadas nestes compostos. O alcalóide harmano apresentou atividade antioxidante por inibir a peroxidação lipídica em preparações microssomais hepáticas *in vitro* (Tse *et al.* 1991). Harmina induziu efeitos neuroprotetores em camundongos, agindo como captador de espécies reativas de oxigênio (EROs), atenuando danos cerebrais nestes animais (Lee *et al.* 2000).

Recentemente, Peres (1999) demonstrou que harmano, harmina, harmol, harmalol e harmalina apresentaram atividade imunossupressora *in vitro* em linfócitos periféricos humanos. Este efeito imunomodulatório foi dependente da estrutura química de cada composto, sendo que harmina mostrou ter um efeito mais pronunciado que harmano, provavelmente devido à presença da metoxila no seu C₇.

1.2.2.3 Interações com o DNA

Vários ensaios físico-químicos foram realizados com o propósito de demonstrar a atividade de harmano e harmina frente ao DNA. Recentemente, Taira *et al.* (1997) e Balón *et al.* (1999) evidenciaram por espectroscopia de absorção e fluorescência e dicroísmo circular que estes alcalóides intercalam-se entre as bases do DNA. Taira *et al.* (1997) observaram que harmina intercala-se mais fortemente que o harmano. Provavelmente, a presença do grupamento polar (-OCH₃) no Carbono-7 da estrutura da harmina facilita sua maior afinidade pelo DNA. Balón *et al.* (1999) demonstraram que harmano liga-se às bases dos ácidos nucleicos formando um complexo com a seguinte ordem de afinidade:

$T \gg G \approx U > C > A$. A natureza exata das forças de atração que envolve a formação do complexo ainda não é esclarecida. No entanto, acredita-se que interações dipolo-dipolo e forças de Van der Waals estabilizam o complexo.

Além disso, algumas β -carbolinas, como o harmano e norharmano, também formam adutos com o DNA. Foi demonstrado que a administração de 0,1% de harmano na alimentação diária de camundongos, por quatro semanas, induz adutos no DNA de células de fígado e rins destes animais (Yamashita *et al.* 1988). Entende-se por adutos a adição (mono- ou bi-adições) de compostos às bases do DNA por ligações covalentes, podendo levar à formação de pontes inter ou intra-cadeias. Estima-se que seres humanos entrem em contato diariamente com uma grama de amins heterocíclicas, como os alcalóides do harmala, provindas de alimentos cozidos (Wakabayashi *et al.* 1997). Estes compostos podem ser formados pelo aquecimento excessivo de alimentos ricos em proteínas, como a carne, por exemplo. Tais substâncias são originadas, portanto, a partir da pirólise do triptofano e são também consideradas co-mutagênicas. Co-mutagênicos são substâncias que, quando combinadas a mutagênicos, potencializam o efeito destes, causando uma série de danos ao DNA. A combinação de derivados de substâncias mutagênicas com o alcalóide harmano, conhecido como co-mutagênico, provavelmente resulta em riscos de desenvolvimento de câncer (Boisset *et al.* 1994).

Em bactérias, como a *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, danos no DNA ou qualquer interferência em sua replicação por agentes como a radiação ultravioleta ou agentes carcinogênicos podem levar à indução de funções SOS que correspondem a

atividades relacionadas com o reparo do DNA. Foi demonstrado que harmano induz resposta SOS nestes organismos (Oda *et al.* 1988; Picada *et al.* 1997).

A troca de cromátides irmãs (SCE – *sister chromatid exchange*) é um excelente indicador de atividade clastogênica e carcinogênica. Acredita-se que a troca entre cromátides irmãs ocorra durante a forquilha de replicação do DNA na fase S. Foi demonstrado que o alcalóide harmano induz SCE em linfócitos periféricos humanos (Madle *et al.* 1981) e também em células linfoblastóides humanas (Tohda *et al.* 1983).

Também foi demonstrado que harmano e harmina produziram aberrações cromossômicas em células CHO (células de ovário de hamster Chinês), após o tratamento destas células com luz UV e mitomicina C, juntamente com um sistema de ativação metabólica (S9-mix) (Sasaki *et al.* 1992). Neste mesmo estudo, porém, ambos os compostos não induziram aberrações cromossômicas quando investigados sem o pré-tratamento com UV.

Estes alcalóides também induziram mutações por alteração do quadro de leitura (mutação *frameshift*) em bactérias (Wehner *et al.* 1979; Oda *et al.* 1988; Picada *et al.* 1997). Harmano induziu esta mutação na linhagem *trpE977* de *E. coli* (Oda *et al.* 1988), enquanto que na linhagem TA1537 de *S. typhimurium*, harmina após sofrer metabolização produz o mesmo efeito (Wehner *et al.* 1979). Já nas linhagens TA97 e TA98 da bactéria, estes compostos apresentaram respostas diferenciadas (Picada *et al.* 1997). Na linhagem TA97, harmano induziu esta mutação em presença de um sistema de ativação metabólica (S9-mix), parcialmente perdendo esta atividade sem metabolização. Harmina, nas linhagens TA98 e TA97, produziu este mesmo evento genético somente em presença de S9-mix, indicando que este alcalóide necessita ser metabolizado para induzir este efeito.

Os efeitos citotóxico e mutagênico de alguns alcalóides e de várias drogas intercalantes também podem ser resultantes da interação com as enzimas topoisomerases (Shen *et al.* 1992; Anderson e Berger 1994; Meikle *et al.* 1995; Takahashi-Hyodo *et al.* 1999). Estas enzimas alteram a topologia do DNA através de rupturas e sucessivas uniões na dupla hélice, promovendo quebras transitórias nas pontes fosfodiéster, gerando uma forma intermediária - onde a proteína permanece ligada covalentemente ao DNA e permite que as fitas do DNA passem umas sobre as outras - alterando, assim, o superenrolamento da molécula. Desse modo, elas permitem a introdução ou remoção de superenrolamentos no DNA. Essas enzimas têm funções importantes nos processos de replicação, transcrição e recombinação e podem fazer parte da estrutura dos cromossomos (Chen e Liu 1994; Poljak e Käs 1995; Wang 1996, 1998; Gangloff *et al.* 1999). Além disso, elas são alvo da ação de muitas drogas antimicrobianas e anticancerígenas (Anderson e Berger 1994; Wang 1996, 1998; Hammonds *et al.* 2000).

As enzimas topoisomerases podem ser classificadas basicamente em dois tipos de acordo com seu mecanismo de reação: DNA-topoisomerase tipo I e DNA-topoisomerase tipo II (Roca 1995). As do tipo I são proteínas monoméricas capazes de catalizar o relaxamento do DNA através de ruptura simples. Esta capacidade parece importante para os processos de replicação e transcrição. As do tipo II, além de provocar o relaxamento do DNA, podem causar quebras duplas e são responsáveis pelas atividades de concatenação/decatenação e ligação/ruptura do DNA. São proteínas essenciais e altamente conservadas em todos os organismos vivos. Em células eucariotas seus níveis aumentam quando as células são estimuladas a se dividirem (Chen e Liu 1994; Wang 1996, 1998).

Funayama *et al.* (1996) analisaram os efeitos dos alcalóides γ - e β -carbolinas sobre a atividade das DNA topoisomerases. Neste estudo, as γ -carbolinas e as β -carbolinas (harmano e norharmano) demonstraram inibir as atividades de relaxamento das topoisomerases I e II. Em adição, neste mesmo estudo, foram confirmadas as atividades destes alcalóides de se intercalarem no DNA, utilizando o DNA plasmidial pBR322 linearizado e T4 DNA ligase. Recentemente, Deveau *et al.* (2001) também observaram que compostos derivados das β -carbolinas inibem as DNA topoisomerases II.

2. ENSAIOS PARA DETECÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA EM EUCARIOTOS

Vários ensaios para a identificação de agentes mutagênicos e/ou genotóxicos vem sendo desenvolvidos (para revisão ver, MacGregor *et al.* 2000). As mutações são detectadas frequentemente através da expressão fenotípica, causada por uma mudança súbita e hereditária no genótipo de um organismo, alterando suas características. A ocorrência de mutações, no entanto, depende da natureza da lesão e das respostas celulares aos danos no DNA. Basicamente, as mutações são divididas em duas grandes categorias: mutações gênicas e cromossômicas. As mutações gênicas são alterações que ocorrem na sequência de nucleotídeos do DNA e as cromossômicas, são as que produzem alterações no número ou na estrutura dos cromossomos e são detectadas por análises citogenéticas. Dependendo do tipo de lesão que se quer detectar são necessários, portanto, diferentes testes.

Os métodos que são mais amplamente empregados para detecção de mutações gênicas são aqueles que utilizam as bactérias (*Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*). Estes são relativamente simples, reprodutíveis e dão resultados confiáveis de interação do produto com o DNA. Contudo, as bactérias são organismos simples, e os resultados obtidos nem sempre são válidos para células animais ou outros eucariontes. Para se obter dados sobre mutação gênica em eucariotos há testes em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), em células de mamíferos, em *Drosophila*, ou mesmo mutações somáticas em mamíferos pelo teste de HGPRT (gene de hipoxantina-guanina fosforibosil-transferase, ligado ao cromossomo X dos mamíferos), ou o “mouse spot test” (alteração da cor do pelo em camundongos tratados durante a embriogênese). Para detecção de mutações cromossômicas os testes mais utilizados incluem as aberrações cromossômicas e micronúcleos, sendo que estes testes exigem que as células estejam em estado proliferativo (Tice *et al.* 1988; Le Curieux *et al.* 1993; MacGregor *et al.* 2000). Estes testes tem um sistema de validação internacional, e podem ser desenvolvidos tanto *in vitro* como *in vivo*, desde que se conheça adequadamente a biologia do organismo-teste. Recentemente, o teste alcalino eletroforético de célula única ou Ensaio Cometa (EC), que detecta quebras no DNA, também tem sido recomendado (Fairbairn *et al.* 1995; Tice 1995; Singh e Stephens 1996; Singh 2000), sendo este realizado em células individuais não proliferativas.

2.1 Avaliação genotóxica

2.1.1 Testes de mutações reversa, conversão gênica e recombinação mitótica na *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* têm sido amplamente estudada, tornando-se ferramenta importante nas pesquisas sobre mutagênese. Os ensaios com leveduras têm sido de grande utilidade na determinação de agentes mutagênicos ambientais ou farmacológicos e servem para complementar os ensaios de mutagenicidade realizados em bactérias (Henriques *et al.* 1987; Poli *et al.* 1999; Terziyska *et al.* 2000). Esses ensaios são rápidos, sensíveis, econômicos e reprodutíveis, apresentando resultados confiáveis na identificação biológica. Além disto, a levedura possui um sistema endógeno de ativação metabólica constituído por um complexo enzimático (citocromo P-450) e detoxificação, sem a necessidade da adição de um sistema exógeno, sendo, desta forma, uma vantagem sobre os ensaios bacterianos (Paula-Ramos *et al.* 1991; Moreno *et al.* 1991; Poli *et al.* 1999).

Experimentos de mutações reversas são os mais comumente utilizados. Estes se baseiam na restauração ou compensação de um defeito gênico responsável por um requerimento nutricional (Zimmermann 1975). A restauração se deve a uma reversão exata do defeito original, enquanto que a compensação pode ser devido a uma mutação secundária dentro do gene (mutação supressora interna) ou por uma mutação externa, como no caso dos alelos sem sentido (*nonsense* – mutação que resulta na alteração de um códon que codifica um aminoácido para um códon de terminação) (Hawthorne e Leopold 1974; Atkin *et al.* 1993). Reversão de auxotrofia para prototrofia pode ser causada por uma substituição, inserção ou deleção de pares de bases, ou ainda uma mutação induzida por

supressor do gene mutante original (Henriques *et al.* 1987). Para que seja identificada a mutação reversa é necessário a utilização de uma linhagem com alterações genéticas adequadas, como por exemplo, a linhagem haplóide de *S cerevisiae* XV 185-14c, isolada por Von Borstel (Parry e Parry 1984). Esta linhagem permite a detecção de dois tipos de mutações locus específicas: reversões do alelo ocre *lys1-1* (alteração para o códon UAA de término de cadeia) ou do alelo *missense his1-7* (códon alterado codifica um aminoácido diferente), e reversões por deslocamento de quadro de leitura do DNA (*frameshift*) verificadas no locus *hom3-10*. As células revertentes podem ser detectadas pelo semeamento em placas contendo meio seletivo no qual o fator de crescimento inicialmente requerido não está presente, ou está em quantidades muito pequenas, permitindo um “background” de crescimento.

A recombinação mitótica é um dos mecanismos usados pelas células para reparar os danos no DNA, restaurando a integridade do DNA. Tais danos podem ser resultantes do metabolismo natural das células, tais como a atividade de espécies reativas de oxigênio, ou quebras duplas no DNA (DSBs) originadas durante a replicação ou durante a transcrição. Quando ocorre uma lesão no DNA, esta pode permanecer irreparável, levando à morte celular, ou pode ser reparável em um processo que envolve a recombinação. Este fenômeno ocorre normalmente em células diplóides e caracteriza-se pela troca de fragmentos do DNA entre cromátides irmãs ou cromossomos homólogos. A recombinação pode ser feita de maneira recíproca (permuta ou *crossingover*) e não recíproca (conversão gênica). Muitos agentes químicos e físicos que induzem mutagênese podem aumentar a frequência de recombinação em células diplóides, como um reflexo de danos induzidos no DNA. Algumas substâncias carcinogênicas, no entanto, são negativas em testes que detectam

mutagênese, mas induzem recombinação, sugerindo que estes fenômenos podem estar interligados (para revisão ver, Kupiec 2000).

No *crossingover*, ou permuta, ocorre a troca recíproca de segmentos de DNA entre dois cromossomos homólogos. Linhagens diplóides heterólogas de *S. cerevisiae* podem ser utilizadas para detecção deste fenômeno, se estas apresentarem em seu genótipo um par de marcadores recessivos, distantes entre si, mas localizados no mesmo braço cromossômico em diferentes homólogos e frente aos alelos selvagens correspondentes. O *crossingover* resulta no posicionamento de ambos alelos recessivos no mesmo cromossomo homólogo, enquanto que os alelos selvagens localizam-se no outro cromossomo homólogo. As células portadoras de ambos alelos em homozigose seriam capazes de restaurar o genótipo original (Zimmermann 1975; Parry e Parry 1984; Henriques *et al.* 1987; Petes *et al.* 1991; Kupiec 2000).

A conversão gênica mitótica é a troca não-recíproca de informação genética entre dois cromossomos homólogos, podendo também ocorrer entre cromátides irmãs e entre membros de uma duplicação intracromátide (Petes *et al.* 1991). Neste caso, é utilizada uma levedura diplóide heterozigótica com dois alelos inativos diferentes no mesmo loco do gene. A presença destes alelos causa uma dependência nutricional, isto é, células crescem somente em meio suplementado com um nutriente específico. Quando ocorre conversão gênica, um fenótipo do tipo selvagem muito ativo é produzido a partir desses alelos inativos, através de uma recombinação intragênica. Essas colônias do tipo selvagem crescem em meio carente do nutriente específico (meio seletivo) (Zimmermann 1975; Parry e Parry 1984; Henriques *et al.* 1987; Petes *et al.* 1991; Kupiec 2000).

Diversas linhagens diplóides de leveduras já foram utilizadas para a determinação destes efeitos recombinogênicos, sendo as mais utilizadas as linhagens D7 (Zimmermann 1975) e XS2316 (Machida e Nakai 1980), sendo esta última a utilizada neste trabalho. A linhagem XS2316 é heterozigota para o locus CYH_2 (+/cyh) e heteroalélica para LEU1 (*leu1-1/leu1-12*), que permite verificar *crossingover* e conversão gênica, respectivamente.

2.1.2 Efeito citotóxico em células de *S. cerevisiae* deficientes em sistemas de reparo de DNA

Quando não se conhece o mecanismo de ação de determinados compostos e não se sabe exatamente que tipo de lesões no DNA podem ser geradas por estas substâncias, pode-se utilizar linhagens da levedura *S. cerevisiae* deficientes em um tipo de reparo para estudar as lesões produzidas pelas mesmas. Um método utilizado para determinação da natureza das lesões induzidas por agentes químicos no DNA, consiste em comparar a sensibilidade de mutantes deficientes em uma via de reparo do DNA com uma linhagem selvagem isogênica proficiente naquele tipo de reparo (Moustacchi *et al.* 1983; Melo *et al.* 1986; Paula-Ramos *et al.* 1991; Pasqual *et al.* 1993). Quando um mutante deficiente em uma via de reparação do DNA apresenta uma sensibilidade maior que a linhagem selvagem proficiente na reparação, pode-se inferir que a substância estudada induz o tipo de lesão incapaz de ser reparada pela mutante.

Nos últimos anos foram descobertos mais de 100 loci independentes com função de reparo de DNA na *S. cerevisiae* (para revisão ver, Moustacchi 1987; Friedberg *et al.* 1995; Nickoloff e Hoekstra 1998). Esses loci estão classificados em três grupos de epistasia que

compreendem três sistemas de reparação do DNA, os quais correspondem, até o momento, as três principais respostas celulares em relação aos danos no DNA: reparação por excisão-ressíntese (tipo *RAD3*), reparação pós-replicativa e/ou mutagênica (tipo *RAD6*) e reparação de quebras de cadeias no DNA por recombinação (tipo *RAD52*) (Friedberg *et al.* 1995; Nickoloff e Hoekstra 1998).

Mutantes pertencentes ao grupo de epistasia *RAD3* são defectivos no sistema de excisão-ressíntese de danos específicos de DNA, como na excisão de dímeros de pirimidina. Os genes pertencentes a esta via participam da reparação por excisão de nucleotídeos, também conhecida por NER (*nucleotide excision repair*) e foram isolados a partir da sensibilidade à radiação UV 254nm, fotoadição de psoralenos, mostardas nitrogenadas e metilmetanosulfonato (para revisão ver, Ramotar e Mansson 1996; Prakash e Prakash 2000; Game 2000).

Os genes pertencentes à via *RAD6* pertencem à via mutagênica ou pós-replicativa, também conhecida como via de reparação sujeita a erros. Esta via de reparação entra em ação no momento de emergência celular e quando os demais mecanismos estão ausentes ou sobrecarregados (Friedberg *et al.* 1995). O grupo inclui mutantes que são sensíveis à radiação UVC, radiações ionizantes, agentes alquilantes e psoralenos fotoativados, apresentando uma resposta mutagênica diferenciada quando expostos a esses agentes (Friedberg *et al.* 1995; Nickoloff e Hoekstra 1998; Game 2000).

Os genes da via *RAD52* fazem a reparação de quebras simples e duplas no DNA, principalmente através de recombinação homóloga (para revisão ver, Friedberg *et al.* 1995; Nickoloff e Hoekstra 1998). Neste grupo há vários genes envolvidos na recombinação meiótica, conversão gênica e recombinação mitótica e, também para a integração de

plasmídeos linearizados (Friedberg et al 1995; Nickoloff e Hoekstra 1998). O mecanismo de reparação desta via parece existir sempre que a fita de DNA aparece duplicada na célula. Esta conclusão foi possível a partir da observação de que a duplicação do DNA (fase S-G2 do ciclo celular) confere um aumento na resistência ao efeito letal de vários mutagênicos físicos e químicos (Game 1993; Game 2000). Este mecanismo é explicado pela capacidade que a célula possui de fazer recombinação entre as fitas de DNA (cromossomos homólogos e cromátides-irmãs), contando com mais uma forma de garantir a integridade do genoma (Game 1993). Em linhagens haplóides de levedura, a recombinação homóloga é um dos mecanismos usados na reparação de quebras de cadeias duplas de DNA (DSBs) as quais são geradas, principalmente, por radiação ionizante e alguns agentes alquilantes, como o metilmetanosulfonado – MMS. Na primeira etapa da meiose, as quebras de cadeias duplas são introduzidas em loci específicos no cromossoma e servem como sítios de iniciação da recombinação (para revisão ver, Friedberg *et al.* 1995; Nickoloff e Hoekstra 1998; Kupiec 2000). Se não forem reparadas corretamente, podem causar deleções mutagênicas, translocações, ou até mesmo a perda cromossomal e morte celular. A instabilidade genômica derivada da incapacidade de reparar os DSBs pode levar também a processos carcinogênicos, através da ativação de oncogenes, à inativação de supressores tumorais ou à perda de heterozigidade (Kanaar *et al.* 1998; Parshad e Sanford 2001).

As interações epistáticas são definidas de acordo com a resposta que linhagens mutantes apresentam em relação a um determinado agente. Quando um duplo mutante é construído de simples mutantes pertencentes ao mesmo grupo de epistasia, ele não deve ser mais sensível ao agente genotóxico do que o mais sensível dos simples mutantes. Isso indica que esses dois genes estão envolvidos em etapas sequenciais de uma rota bioquímica

ou, então, que fazem parte de um complexo multimérico ou multiproteico. Entretanto, se os simples mutantes pertencem a grupos epistáticos distintos, a dupla mutação mostra uma sensibilidade aumentada, chamada de sinérgica, indicando que as duas vias de reparação competem para o mesmo tipo de lesão (Friedberg *et al.* 1995; Henriques *et al.* 1997; Game 2000). Uma outra interação, denominada de aditiva, indica que a sensibilidade do duplo mutante é igual à soma da inativação observada na linhagem selvagem, mais o incremento da inativação dos dois simples mutantes. Neste caso, cada mutação bloqueia vias diferentes de reparação, que não competem pelo mesmo tipo de lesão (Brendel e Haynes 1973; Henriques *et al.* 1987; Benfato *et al.* 1992; Friedberg *et al.* 1995; Game 2000).

2.2 Ensaios em cultura de células de mamíferos

O uso de sistemas de ensaio em eucariotos e em particular ensaios em células de mamíferos, são frequentemente citados como sendo os mais relevantes para a análise do potencial mutagênico e carcinogênico de produtos químicos em humanos (Tice *et al.* 1994; Müller e Sofuni 2000). Os organismos preferidos para análise *in vivo* e *in vitro* são os roedores, devido a uma correlação elevada entre mutações em humanos e roedores (Tice *et al.* 1994; MacGregor *et al.* 2000). Hoje em dia já foi bem evidenciado que a correlação de mutagenicidade cromossômica pode ser feita entre todos os eucariotos.

Fibroblastos de pulmão de hamster Chinês (células V79) corresponde a uma das linhagens de células de mamíferos mais utilizadas em testes citogenéticos de curta duração (Bradley *et al.* 1981). Em geral, o tempo de duplicação destas células é de 12-16 horas, a 37°C, com 5% de CO₂. Esta linhagem é capaz de iniciar rapidamente um crescimento

exponencial a partir de um pequeno inóculo e apresentam alta eficiência de plaqueamento. Podem ser estocadas em nitrogênio líquido, recuperando-se rapidamente após o seu descongelamento, permitindo, portanto, a manutenção de grandes estoques destas células com características reprodutíveis e similares, como por exemplo, a baixa frequência de mutações (Bradley *et al.* 1981). Apresentam, ainda, um cariótipo estável com 22 ± 1 cromossomos, de fácil identificação através de microscópio óptico.

Estas células podem, também, ser combinadas com um sistema de ativação metabólico exógeno (S9-mix) para se analisar os efeitos biológicos de compostos que necessitem de ativação enzimática para serem metabolizados (compostos genotóxicos e/ou mutagênicos indiretos).

2.2.1 Análise de aberrações cromossômicas

A análise de aberrações cromossômicas é um dos poucos métodos diretos para mensurar mutações ou outras formas de danos induzidos em testes *in vivo* em humanos (Albertini *et al.* 2000) e em animais, e em testes *in vitro* em culturas de células expostas a mutagênicos e carcinogênicos potenciais (Müller e Sofuni 2000; Galloway 2000; MacGregor *et al.* 2000). Existe na literatura um número muito grande de trabalhos na área de mutagênese que mostram a indução de aberrações cromossômicas por uma série de agentes mutagênicos de diferentes tipos, quer sejam de natureza química, física ou mesmo biológica.

Muitos são os agentes indutores de aberrações cromossômicas, isto é, agentes clastogênicos, incluindo-se os análogos de bases, agentes alquilantes, compostos que

interferem na duplicação do DNA, agentes intercalantes, inibidores das DNA topoisomerasas, etc., existindo, desta forma, uma variedade de substâncias químicas que induzem diferentes tipos de lesões no DNA, que resultam na formação de aberrações cromossômicas (Carrano e Natarajan 1988; Wassermann 1994; Ferguson e Baguley 1996).

Natarajan e Zwanengurg (1982) classificam os agentes clastogênicos em duas categorias: os dependentes da fase S, e os independentes da fase S. Os agentes dependentes da fase S são aqueles que induzem aberrações do tipo cromatídica (envolvendo apenas uma cromátide) independente do estágio do ciclo celular em que se faz o tratamento, sendo que a visualização das mesmas só é possível após a passagem das células por um período S. Agentes alquilantes e a maioria das substâncias químicas pertencem a esta categoria. Já os agentes independentes da fase S são os que induzem aberrações do tipo cromossômicas (envolvendo ambas as cromátides de um cromossomo) em células em fase G_0/G_1 do ciclo celular e do tipo cromatídica em células em fase S/ G_2 . As radiações ionizantes e a bleomicina são exemplos deste tipo.

Os tipos de lesões produzidas no DNA responsáveis pela formação das aberrações cromossômicas são classificadas segundo Natarajan (1984):

- a) Quebras de cadeia: induzidas por radiação ionizante, UVC e bleomicina.
- b) Dímeros de pirimidina: induzidos por UVC.
- c) Alquilação de bases: induzidas por agentes alquilantes.
- d) Ligações cruzadas inter e intracadeia: induzidas por agentes alquilantes polifuncionais, psoralenos e UVA.

Quando uma lesão é induzida no DNA, esta pode ser totalmente reparada por mecanismos de reparo celular. As lesões não reparadas ou reparadas erroneamente

originam as aberrações cromossômicas (Albertini *et al.* 2000), sendo que estas devem ser formadas como consequência de falhas na tentativa de as células repararem o dano no DNA ou contorná-lo de algum modo durante a duplicação.

As alterações são visualizadas pela análise cromossômica através de microscópio óptico, e os tipos de aberrações são classificados segundo Carrano e Natarajan (1988; Figura 5). Estas baseiam-se no número de cromátides irmãs e quebras envolvidas no evento (cromossômicas x cromatídicas). Aberrações cromossômicas simples (por exemplo: quebras, deleções) são supostamente envolvidas apenas em um evento de quebra simples, enquanto aberrações complexas (rearranjos dentro e entre cromossomos) envolvem múltiplas quebras e eventos mal reparados (*misrepair*) (Albertini *et al.* 2000). *Gaps* (regiões não coradas) são registrados, durante as análises dos cromossomos, separadamente. Estas informações sobre o tipo de aberrações são importantes para a interpretação dos resultados.




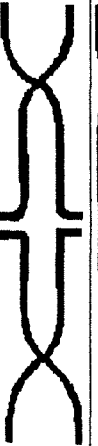





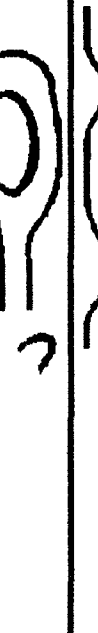






		ABERRAÇÕES CROMATÍDICAS								ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS									
NORMAL	GAP CROMATÍNICO	GAP ISOCROMATÍNICO	TROCA CROMATÍDICA					ISOCROMATÍDICA			DICÊNTRICO	ANEL	TRICÊNTRICO	ANEL ACÊNTRICO	DELEÇÕES				
			INTERTROCA		INTRATROCA			INTER-TROCA	INTRA-TROCA									IN-TERTICIAIS	TERMINAIS
			SIMÉTRICA	ASSIMÉTRICA	SIMÉTRICA	ASSIMÉTRICA	SIMÉTRICA												
																			
							OBS: Assimétrica não distinguível	OU											

Figura 5 – Classificação das aberrações cromossômicas segundo Carrano e Natarajan 1988.

2.2.2 O Ensaio Cometa

O ensaio Cometa ou teste de eletroforese para célula única em gel (SCGE - *single cell gel electrophoresis*) é uma técnica simples, rápida e sensível para mensurar e analisar lesões e detectar efeitos de reparo no DNA (Singh *et al.* 1988; Fairbairn *et al.* 1995) em células individuais expostas à agentes genotóxicos. Os danos mais facilmente detectados no DNA são quebras (simples ou duplas), danos alcali-lábeis, ligações cruzadas e quebras resultantes de reparo por excisão não concluídas (Singh *et al.* 1988; Fairbairn *et al.* 1995; Speit e Hartmann 1999; Merk e Speit 1999; Albertini *et al.* 2000).

Este teste apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, entre estes é que pode ser utilizado em qualquer tipo de células, sendo necessária apenas um pequeno número das mesmas e de não ser necessário células em divisão. Pode ser usado em testes *in vitro* e *in vivo* de indução de danos no DNA por qualquer agente clastogênico (Hartmann *et al.* 1994, 1995a,b). Atualmente este método já foi adaptado para qualquer tipo de célula isolada, além de ser aplicado a diversos organismos para avaliações em sistemas ambientais (Tice 1995 ;Silva *et al.* 2000a, 2000b).

Existe dois tipos de protocolos para este teste: (a) tratamento neutro, que detecta duplas quebras no DNA; e (b) tratamento alcalino, que detecta simples quebras e danos alcali-lábeis (Fairbairn *et al.* 1995). Esta técnica tem sido modificada também para detectar adutos no DNA (dímeros de timina, danos oxidativos) usando anticorpos específicos (Sauvaigo *et al.* 1998) ou enzimas de reparo do DNA (Collins *et al.* 1993, 1996; Speit e Hartmann 1999).

Nesta técnica de microgel para eletroforese as células são embebidas em gel de agarose em lâminas para microscopia, lisadas sob condições alcalinas (ou neutras), fazendo-se passar uma corrente elétrica, que faz migrar para fora do núcleo os segmentos de DNA livres, resultantes das quebras. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano reconhecível no DNA. As células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, como de um cometa, formada pelos fragmentos de DNA (Figura 6). Estes fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos e ainda estar associados ao núcleo por uma cadeia simples (Fairbairn *et al.* 1995).



Figura 6 - Visualização da imagem de uma célula "cometa", onde a "cabeça" representa o núcleo original e a "cauda" os fragmentos de DNA (Extraído de Silva 1999).

Os danos podem ser identificados de diferentes maneiras, uma delas é medir o comprimento do DNA migrado com a ajuda de uma ocular micrométrica, outra é classificar visualmente as células com dano em diferentes classes, podendo obter um valor arbitrário que expresse o dano geral que uma população de células sofreu (Collins *et al.* 1997; Speit e Hartmann 1996; Silva *et al.* 2000 a, b). Atualmente, a importância e o interesse aumentado pelo teste Cometa levou ao desenvolvimento de sistemas analisadores de imagens, que servem para quantificar a cromatina que migrou para fora do núcleo (McKelvey-Martin *et al.* 1993; Collins *et al.* 1997).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar a genotoxicidade dos alcalóides β -carbolínicos harmano e harmina em dois sistemas eucariotos: na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e em cultura de células de pulmão de hamster Chinês (células V79).

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a citotoxicidade dos alcalóides β -carbolínicos harmano e harmina na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

- Avaliar os possíveis efeitos mutagênico e recombinogênico destes alcalóides em linhagens haplóide e diplóide da levedura *S. cerevisiae*, portadoras de marcas genéticas apropriadas.

- Estudar a sensibilidade de linhagens deficientes e proficientes em sistemas de reparação do DNA provocados por harmano e harmina, com a finalidade de determinar o tipo de lesão provavelmente induzida por estes alcalóides.

- Determinar *in vitro* as atividades citotóxicas de harmano e harmina em culturas de fibroblastos de pulmão de hamster Chinês (células V79) e seus efeitos clastogênicos (aberrações cromossômicas)

- Avaliar os danos no DNA provocados por harmano e harmina em células V79 utilizando o Ensaio Cometa.

II - CAPÍTULO I

**Genotoxic and Recombinogenic Activities of the Two β -
Carboline Alkaloids Harman and Harmine in
*Saccharomyces cerevisiae***

Aceito para publicação na *Mutation Research*

**Genotoxic and Recombinogenic Activities of the
Two β -Carboline Alkaloids Harman and Harmine
in *Saccharomyces cerevisiae***

Jane Marlei Boeira¹; Alice Fialho Viana²; Jaqueline Nascimento Picada¹
and João Antonio Pêgas Henriques^{1,*}

¹ Departamento de Biofísica e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

² Faculdade de Farmácia, Departamento de Produção de Matéria-Prima,
UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

***Address for Correspondence:** Centro de Biotecnologia, UFRGS; Av. Bento
Gonçalves, 9500, Prédio 43421; Campus Do Vale; Caixa Postal 15005; CEP 91501-
970, Porto Alegre, RS, Brasil; Fax.: 00 55 51 316 60 84; E-mail:
pegas@dna.cbiot.ufrgs.br

Abstract

The cytotoxic β -carboline alkaloids harman and harmine occur in medical plants and in a variety of foods, alcoholic beverages, and industrial waste. We applied them to the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to test for putative genotoxicity, mutagenicity and recombinogenicity and to determine whether harman and harmine produced repairable DNA damage. Harmine was more cytotoxic than harman for exponentially growing haploid and diploid cells. Only harmine induced crossing-over and mitotic gene conversion but both alkaloids were frameshift mutagens in yeast. Mutants defective in excision-resynthesis repair (*rad3* and *rad1*), in error-prone repair (*rad6*) and in recombinational repair (*rad52*) showed enhanced sensitivity to harmine and harman, but the ranking of sensitivities was different for the two alkaloids. It appears that both alkaloids are probably capable of inducing DNA single and/or double strand breaks. An epistatic interaction was shown between *rad3-e5* and *rad52-1* mutants alleles, indicating that excision-resynthesis and strand-break repair may have common steps in the repair of DNA damage induced by these alkaloids. The non-epistatic interaction observed in *rad1* Δ *rad6* Δ double mutants indicated that both excision-resynthesis and error-prone repair are independently involved in repair of harman and harmine-induced DNA lesions.

Key words: Harman, Harmine, Cytotoxicity, Mutagenicity, Recombinogenesis, *Saccharomyces cerevisiae*

1. Introduction

Harman and harmine (Fig. 1) are naturally occurring β -carboline alkaloids that are widely distributed in plants [1]. *Passiflora spp.* (Passifloraceae), popularly known as maracujá, which contain β -carboline alkaloids, such as harman, are the plants widely used in medical practice in Brazil, mainly for their anti-spasmodic and sedative properties [2]. Harman has also been detected in a variety of environmental sources including foods, alcoholic beverages, and industrial waste [3-7]. In addition, it is also present in mammalian tissues and body fluids, including human brain, cerebrospinal fluid, blood platelets, milk, urine, liver, kidney and lens [8-11]. Harmine has been found in human plasma after the ingestion of "ayahuasca" [12], a beverage that is used for religious purposes in Brazil. This beverage involves the combination of extracts *Banisteriopsis caapi* vine, which contain harmine, with that of other plants tryptamine-rich such as *Psychotria viridis*, that cause a variety of psychoactive effects [13, 14].

These β -carboline alkaloids exhibit a diverse range of pharmacological and biochemical activities, including the inhibition of monoamine oxidase [15] and cytochrome P-450 [16], binding to benzodiazepine [17-19] and serotonin receptors [19, 20]. Funayama *et al.* [21] demonstrated that these compounds also inhibited the relaxation activity of DNA topoisomerase I and II. Moreover, toxic and mutagenic effects of both β -carboline alkaloids have been reported in prokaryotic and eukaryotic cells. Harman showed mutagenic activity in Chinese hamster lung cells (CLS) in the absence of metabolic activation [22] and it was capable to induce sister chromatid exchange (SCE) in human peripheral lymphocytes [23]. In addition, harman and its related β -carboline harmine induced chromosome aberrations in Chinese hamster ovary

cells (CHO) after treatment with UV light and mitomycin C, in the presence of a metabolic activation system (S9-mix) [24]. Harmine increased the micronuclei frequency and SCE in meristematic cells of *Allium cepa*, by UV light [25]. Various studies showed the co-mutagenic activities of harman in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains [26, 27]. Furthermore, harman and harmine induced frameshift mutation in *S. typhimurium* TA97 and TA98 [28] and in *E. coli* KMBL3835 [29].

Some of the biological and pharmacological effects of these β -carboline alkaloids may be linked to their ability of DNA intercalation [10, 30-32] leading to altered DNA replication fidelity or to an influence on enzymatic activities in DNA repair processes [21, 33]. In fact, it is well known that the mutagenic and carcinogenic effects of various compounds are related to their ability of DNA intercalation [34]. Since it is not clear how these alkaloids influence DNA and its repair, we chose the unicellular eukaryotic organisms *Saccharomyces cerevisiae* to determine whether harman and harmine produce repairable DNA damage and whether they induce mutagenesis and recombinogenic effects in this yeast. Mutagenicity was tested in a haploid *S. cerevisiae* strain XV185-14c, which permits the detection of two types of locus-specific (reversion of the *lys1-1* ochre or *his1-7* missense) and frameshift (*hom3-10*) mutations. Possible recombinogenic effects of harman and harmine was investigated by using the diploid yeast strain XS2316 [35], which allows the detection of two forms of mitotic recombination (crossing-over and gene conversion). In order to study the chemical nature of the DNA lesions produced by harman and harmine we included yeast mutants defective in given DNA-repair pathways of induced lesions in our study.

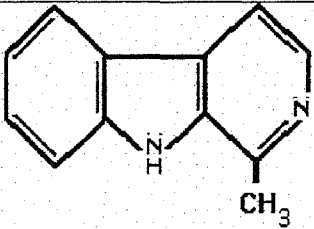
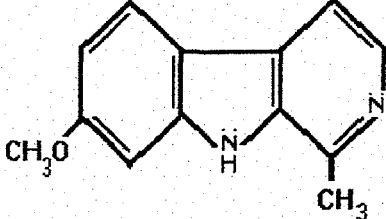
Alkaloid	Chemical name	Chemical structure
Harman	1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole	
Harmine	7-methoxy-1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole	

Figure 1 - Nomenclature and structural formula of the harman and harmine alkaloids

2. Materials and Methods

2.1 Strains

The relevant genotypes of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this work are listed in Table 1. The haploid XV-185-14c was used for mutagenic assay (R. C. Von Borstel, Edmonton, Canada). For mitotic recombination assay was used the diploid strain XS2316 [35]. The isogenic strains containing *rad1Δ* mutant, defective in excision-resynthesis repair, the mutant *rad6Δ*, blocked in the mutagenic repair pathway, and the double mutant *rad1Δ rad6Δ* were kindly provided by M. Grey (Frankfurt, Germany). The *rad3-e5* and *rad52-1* mutants, defective in excision-resynthesis repair and in DNA strand break repair, respectively, were obtained from the sporulations and tetrad analysis from diploid of the genotype described in Table 1 [36].

Table I. *Saccharomyces cerevisiae* Strains Used in This Study.

Strains	Relevant genotypes	Source
Haploid:		
XV185-14c	MAT α <i>ade2-2 arg4-17 his1-7 lys1-1 trp5-48 hom3-10</i>	R. C. Von Borstel
Y202	MAT α <i>ura3-Δ100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 can1-100</i>	M. Grey
<i>Rad1Δ</i>	MAT α <i>ura3-Δ100 ade2-1 his3-11,15 trp1-1 can1-100 rad1::LEU2</i>	M. Grey
<i>Rad6Δ</i>	MAT α <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 rad6::URA3</i>	M. Grey
<i>Rad1Δ rad6Δ</i>	MAT α <i>ade2-1 his 3-11,15 trp1-1 can1-100 rad1::LEU2 rad6::URA3</i>	M. Grey
Diploid:		
JH500 ^a	MAT α <i>rad3-e5</i> + + + + + + <hr/> MAT α + <i>rad52-1 ade2-1 arg4-17 his1-7 his5-2 leu1-12</i> + + + <hr/> <i>lys1-1 trp5-48 hom3-10</i>	[36]
XS2316	+ <i>leu1-1 trp5-48</i> + + + MAT α <i>his1-1</i> <hr/> <i>ade6 leu1-12</i> + <i>cyh2 met13 lys5-1</i> MAT α <i>his1-1</i>	[35]

^a Genotypes of zygotes from which haploid segregants were derived.

2.2 Chemical products

The alkaloids harman (CAS 21655-84-5) and harmine (CAS 343-27-1; aprox. 98% purity) hydrochloride were obtained from Sigma Co (St. Louis, MO, USA). For the treatment of yeast cells, 5mg/ml stock solutions of both alkaloids were prepared immediately prior to use. Harmine was dissolved in distilled water and harman in 5% dimethylsulfoxide (DMSO) and distilled water. The appropriate concentrations were obtained by dilution of stock solutions in saline or in YPD medium. The solvent controls included in the genetic tests were found to be negative. 4-Nitroquinoline N-oxide (4-NQO; Sigma Co) was used as positive control.

2.3 Media

The complete liquid medium (YPD) containing 0.5% yeast extract (Difco), 2% bactopectone (Difco) and 2% dextrose (Difco) was used for routine growth. For plates, the medium was solidified with 2% bactoagar (Difco). The minimal medium (MM) contained 0.67% yeast nitrogen base without amino acids (Difco), 2% glucose and 2% bacto-agar (Difco). The synthetic complete medium (SC) was MM supplemented with 2 mg adenine, 2 mg arginine, 5 mg lysine, 1 mg histidine, 2 mg leucine, 2 mg methionine, 2 mg uracil, 2 mg tryptophan and 24 mg threonine per 100 ml MM. For mutagenesis, the omission media, lacking lysine (SC-lys), histidine (SC-his), or homoserine (SC-hom) were sub-supplemented with 0.1 mg lysine, histidine or methionine, respectively, per 100 ml omission medium. The SC-lysine medium contained only 0.5 mg adenine. For recombinogenesis, leucine was omitted from the synthetic medium (SC-leu), or supplemented with 200 µg cycloheximide (SC+cyh; Calbiochem, CA, USA) per 100 ml SC.

A 0.9% NaCl solution was employed for dilution of cell suspensions. Phosphate-buffered saline (PBS; Na₂HPO₄ and NaH₂PO₄; 20mM; pH 5.8) was used for incubation of cells in exponential and stationary phases without growth.

2.4 Growth yeast conditions

Stationary-phase cultures were obtained by inoculation of an isolated colony in liquid YPD medium. After 72 h incubation at 30°C with aeration by shaking, the cultures contained 2-3x10⁸ cells/ml.

Exponential-phase cultures were obtained by inoculation of 5x10⁵ cells/ml of the same YPD culture in stationary phase into 5 ml of fresh YPD medium. After 18 h incubation, at 30°C, with aeration by shaking, the cultures contained 1-2x10⁷ cells/ml with 20-30% budding cells. Cells were harvested and washed twice with saline. The cell number and proportion of budding cells were determined by counting in a hemocytometer.

2.5 Survival assays

Relative sensitivities of the strains were assayed by inoculating 5x10⁵ cells/ml from an exponentially growing culture in 1 ml of YPD to which harman and harmine at various concentrations were added. Unless otherwise specified, cells were incubated with aeration by rotary shaking at 30°C for 20 h. The cell number was estimated by hemocytometer counting. For the determination of the colony-forming ability, suitable aliquots were plated in YPD. Plates were incubated at 30°C for 3-5 days before counting the surviving colonies. In order to study the effect of the alkaloids under nongrowth conditions, cells in stationary and exponential phases of growth at a

concentration of 2×10^8 cells/ml in phosphate buffered saline (PBS) were treated as indicated above. Assays were repeated at least three times and plating was in triplicate for each dose.

2.6 Detection of harman and harmine-induced reverse and frameshift mutation

The haploid strain XV-185-14c was used for assaying mutagenicity. A suspension of 2×10^8 cells/ml in exponential growth or stationary phase was incubated for 20 h at 30°C with various concentrations of harman or harmine. The survival was determined on SC (3-5 days, 30°C) and mutation induction (LYS, HIS or HOM revertants) on appropriate omission media (7-10 days, 30°C). Whereas *his1-7* is a non-suppressible missense allele and reversions result from mutations at the locus itself [37] *lys1-1* is a suppressible ochre nonsense mutant allele [38] which can be reverted either by locus-specific or by a forward mutation in a suppressor gene [39, 40]. Distinction between true reversions and forward (suppressor) mutations at the *lys1-1* locus was according Schuller and Von Borstel [41], where the reduced adenine content of the medium SC-lys shows locus reversions as red colonies and suppressor mutations as white colonies. It is believed that *hom3-10* contains a frameshift mutation due to its response to a range of diagnostic mutagens [40]. Assays were repeated at least three times and plating was in triplicate for each dose.

2.7 Detection of induced mitotic recombination

Suspensions of cells in exponential growth phase (2×10^8 cells/ml) were incubated in PBS for 20 h at 30°C with various concentrations of harman or harmine. When testing the alkaloids during growth, 5×10^5 cells/ml were treated in YPD as

described above. After treatments, the cells were diluted in saline, plated on three kinds of medium (SC, SC-leu and SC+cyh) and incubated for 7-10 days at 30°C. Colonies grown on SC medium yielded data of cell survival and colonies grown on SC-leu and SC+cyh were scored for intragenic recombination (gene conversion) and intergenic recombination (crossing-over), respectively. In order to measure the exact frequency of reciprocal crossing-over, it was necessary to eliminate the possibility that some cycloheximide-resistant colonies had resulted from reversion at the *CYH2* locus, as well as from monosomy of chromosome VII. For this purpose, the cycloheximide-resistant colonies were replica-plated on a series of plates with SC-lys, SC-met and SC-ade media, for screening these markers for *cyh2*. Assays were repeated at least three times and plates were done in triplicate for each dose.

3. Results

3.1 Cytotoxic effects

Harman and harmine neither induced cytotoxic effect in stationary phase cultures of haploid wild type (WT) yeast (Table II). However, when the WT cultures were treated during exponential phase, either in PBS (Table III, upper panel) or in growth conditions (Table III, lower panel), both alkaloids were able to induce dose-dependent cytotoxicity. However, harmine showed a more pronounced cytotoxic effect.

Figure 2 shows that the relative sensitivities to harman and harmine depend on the repair capacity of yeast. The single mutants *rad3-e5* (Fig 2A) and *rad1Δ* (Fig 2B), which are defective in excision-resynthesis DNA repair pathway, exhibited a intermediate sensitivity to both alkaloids. The recombination-deficient *rad52-1* mutant

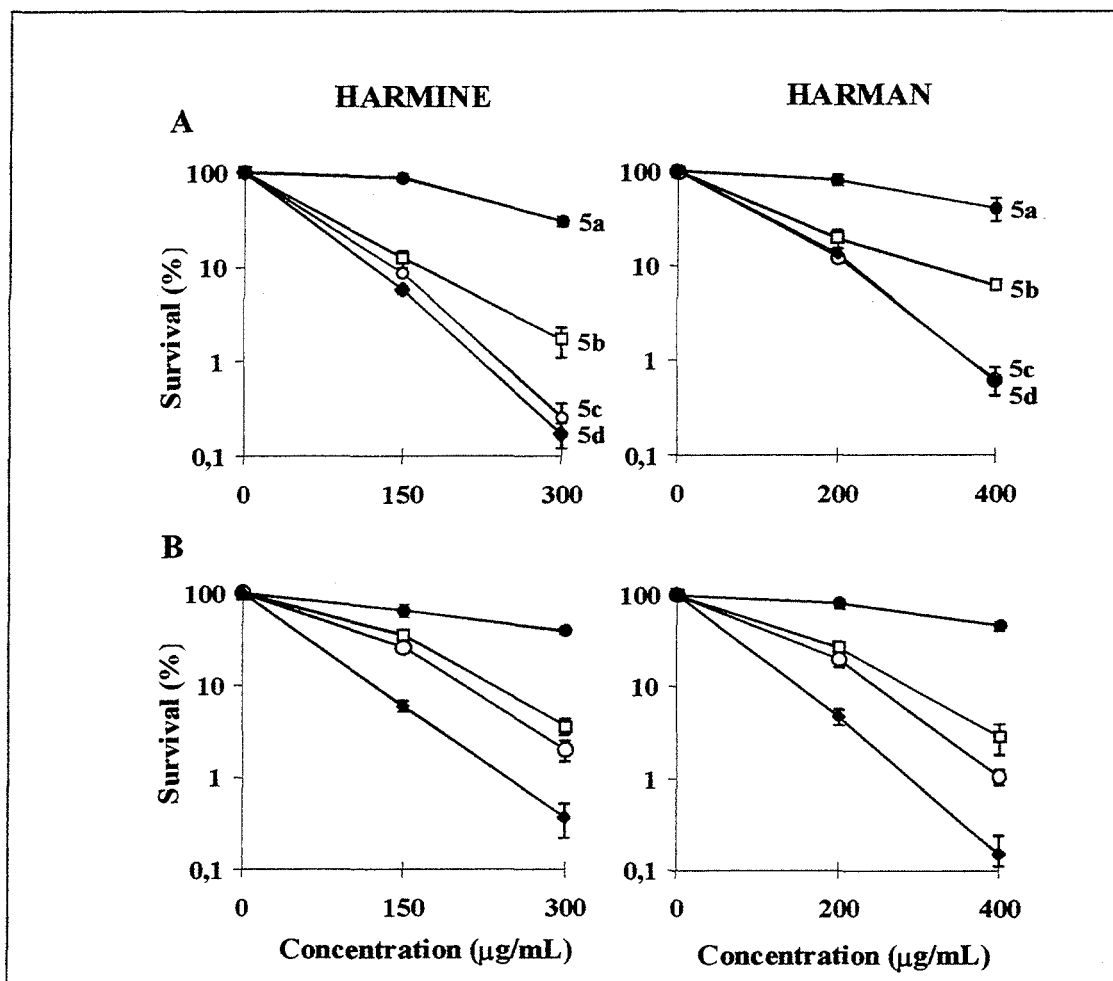


Figure 2. Sensitivity to harmine (left) and harman (right) alkaloids of different *rad* mutants haploid treated in exponential phase in PBS: (A) strains from crosses of *rad3-e5* with *rad52-1*: ● WT (RAD^+ , 5a); □ *rad3-e5* (5b); ○ *rad52-1* (5c); ◆ *rad3-e5 rad52-1* (5d); (B) ● WT (RAD^+); □ *rad1*Δ; ○ *rad6*Δ; ◆ *rad1*Δ *rad6*Δ.

showed a strong sensitivity after treatment with harman and harmine (Fig 2A). The mutant *rad6*Δ (Fig 2B), which is blocked in the mutagenic repair pathway, has shown an important sensitivity to both alkaloids. The double mutant *rad3-e5 rad52-1* shows similar sensitivity as the single mutant *rad52-1* (Fig 2A). This response indicates an epistatic interaction between *rad3-e5* and *rad52-1* for both harmine and harman treatments. In contrast, the double mutant *rad1*Δ *rad6*Δ was more sensitive than the most sensitive single mutants *rad6*Δ, thus exhibiting a non-epistatic interaction between excision and error-prone repair of DNA lesions induced by both alkaloids.

3.2. Mutagenic effects

Results of mutagenicity tests are shown in tables II and III. It is clearly that harman and harmine did not shown any mutagenic effect in stationary phase of growth (Table II). Both alkaloids increased the frequencies of point ($HIS1^+$, $LYS1^+$) and frameshift ($HOM3^+$) mutations during exponential phase when treated in PBS (Table III). Mutant frequencies of both alkaloids for the *his1* locus were significant only at higher doses, while the mutant frequencies for *lys1* and *hom3* loci were significant at almost all doses. However, only suppressors (forward mutations) could be scored for *lys1-1* (Table III). Harman and harmine also induced *hom3* revertants as true frameshift mutations. However, both compounds were not able to induce either point or frameshift mutations when the cells were treated in medium during growth (Table III, lower panel).

3.3 Recombinogenic effects

The recombinogenic effect of harman and harmine was investigated in exponential diploid yeast cultures held under either growth or non-growth (PBS) conditions (Table IV). Neither harman nor harmine induced statistically significant (Students' t-test) recombinogenic events in PBS (Table IV, upper panel). However, a significant crossing-over and gene conversion induced by harmine can be observed in growing diploid cells, whereas harman could not able to induce any recombinogenic effects under these conditions (Table IV, lower panel).

Table II. Induction of Point Mutation (*his1-7*), Ochre Allele (*lys1-1*) and Frameshift (*hom3-10*) Mutations in Haploid XV185-14c Strain of *S. cerevisiae* After Harman and Harmine Treatments in the Stationary Phase in PBS

Agent	Treatment ($\mu\text{g/ml}$)	Survival (%)	His1/10 ⁷ survivors ^a	Lys1/10 ⁷ survivors ^b	Hom3/10 ⁷ survivors ^a
4NQO ^e	0	100 (447) ^c	14.1 \pm 4.0 ^d (126) ^c	3.3 \pm 0.9 ^d (30) ^c	2.2 \pm 0.3 ^d (20) ^c
	0.5	60.6 (271)	123.0 \pm 17.6*** (1099)	32.9 \pm 4.4*** (295)	12.0 \pm 2.4*** (107)
Harman	0	100 (406)	12.8 \pm 4.0 (104)	4.2 \pm 0.5 (35)	2.5 \pm 0.8 (18)
	100	93.6 (380)	13.1 \pm 3.8 (93)	4.4 \pm 1.1 (35)	3.2 \pm 1.0 (21)
	200	94.0 (381)	11.7 \pm 2.9 (103)	4.8 \pm 0.5 (35)	2.9 \pm 1.3 (22)
	300	94.9 (385)	11.7 \pm 3.2 (97)	4.4 \pm 0.3 (37)	3.2 \pm 2.0 (24)
	400	94.9 (385)	10.0 \pm 0.9 (85)	4.3 \pm 0.4 (32)	2.6 \pm 2.3 (20)
Harmine	0	100 (414)	12.7 \pm 4.0 (106)	4.2 \pm 0.5 (35)	2.3 \pm 0.8 (18)
	100	94.5 (391)	13.8 \pm 3.5 (108)	4.7 \pm 1.2 (37)	2.1 \pm 1.3 (17)
	200	93.4 (386)	13.5 \pm 4.8 (105)	5.1 \pm 0.4 (38)	2.0 \pm 0.8 (15)
	300	89.9 (372)	12.5 \pm 4.5 (94)	4.5 \pm 0.7 (34)	2.2 \pm 0.9 (17)
	400	92.1 (381)	11.7 \pm 5.4 (89)	4.2 \pm 0.9 (33)	2.3 \pm 0.8 (18)

^a Locus-specific revertants; ^b Locus non-specific revertants (forward mutation); ^c Numbers in parenthesis are the actual numbers of colonies scored in three plates for each dose; ^d Standard deviation; ^e Positive control; *** Data significant in relation to negative control group (solvent) at $P < 0.001$ / two-tailed Students' t-test.

Table III. Induction of Point Mutation (*his1-7*) Ochre Allele (*lys1-1*) and Frameshift (*hom3-10*) Mutations in Haploid XV185-14cStrain of *S. cerevisiae* After Harman and Harmine Treatments.

Agent	Treatment (µg/ml)	Survival (%)	His1/10 ⁷ survivors ^a	Lys1/10 ⁷ survivors ^b	Hom3/10 ⁷ survivors ^a
4NQO ^e	0	100 (340) ^o	9.3 ± 1.9 ^d (63) ^c	5.1 ± 0.5 ^d (35) ^c	4.6 ± 0.4 ^d (31) ^c
	0.5	55.3 (188)	152.6 ± 28.0*** (1037)	54.6 ± 4.1*** (60)	15.9 ± 2.8*** (108)
<i>Exponential cells treated in PBS</i>					
Harman	0	100 (341)	9.0 ± 1.8 (60)	4.8 ± 0.7 (34)	3.6 ± 0.4 (27)
	100	87.9 (299)	10.7 ± 2.7 (59)	9.3 ± 2.2** (56)	5.9 ± 0.7*** (35)
	200	48.2 (164)	12.3 ± 3.0 (37)	12.8 ± 2.1*** (42)	9.8 ± 2.7*** (31)
	300	23.8 (81)	10.0 ± 1.4 (21)	13.8 ± 5.4** (25)	10.2 ± 4.0** (16)
	400	14.6 (50)	15.6 ± 3.5** (15)	14.5 ± 3.3*** (14)	23.8 ± 3.1*** (20)
Harmine	0	100 (346)	9.4 ± 1.6 (61)	5.0 ± 0.8 (35)	3.6 ± 0.5 (28)
	50	89.4 (309)	6.8 ± 0.6 (41)	6.0 ± 0.5 (42)	5.0 ± 1.5 (33)
	100	73.5 (254)	11.5 ± 1.4 (54)	10.4 ± 0.4*** (53)	9.8 ± 2.1*** (49)
	150	43.8 (151)	17.2 ± 3.6** (52)	14.8 ± 1.8*** (45)	11.6 ± 4.0** (32)
	200	25.0 (86)	19.5 ± 3.4*** (34)	12.9 ± 2.0*** (22)	12.4 ± 3.1*** (22)
<i>Cells treated during growth</i>					
Harman	0	100 (629)	12.9 ± 2.8 (162)	4.6 ± 1.6 (58)	2.3 ± 0.2 (29)
	100	81.8 (514)	14.2 ± 1.7 (146)	4.5 ± 0.3 (46)	3.8 ± 0.6 (39)
	200	69.9 (440)	14.5 ± 0.0 (128)	4.7 ± 0.2 (42)	3.3 ± 0.3 (30)
	300	50.2 (316)	16.5 ± 4.1 (104)	4.0 ± 1.0 (26)	3.2 ± 0.3 (20)
	400	31.5 (198)	14.8 ± 2.0 (58)	4.7 ± 0.0 (19)	3.6 ± 0.9 (14)
Harmine	0	100 (508)	14.7 ± 5.5 (151)	3.7 ± 1.6 (38)	2.1 ± 0.8 (22)
	50	91.1 (463)	15.7 ± 1.7 (146)	4.4 ± 0.7 (41)	3.2 ± 0.1 (29)
	100	78.1 (396)	17.2 ± 0.8 (136)	5.6 ± 0.4 (45)	1.9 ± 0.6 (15)
	150	44.1 (224)	12.8 ± 5.5 (58)	4.6 ± 3.4 (21)	1.8 ± 0.8 (08)
	200	21.6 (110)	12.7 ± 0.3 (28)	5.1 ± 1.6 (11)	3.1 ± 0.5 (07)

^a Locus-specific revertants; ^b Locus non-specific revertants (forward mutation); ^c Numbers in parenthesis are the actual numbers of colonies scored in three plates for each dose; ^d Standard deviation; ^e Positive control; **Data significant in relation to negative control group (solvent) at $P < 0.001$; *** $P < 0.001$ / two-tailed Students' t-test.

Table IV. Induction of Crossing-over (+/*cyh2*) and Gene Conversion (*leu1-1/leu1-12*) in Diploid XS2316 Strain of *S. cerevisiae*

After Harman and Harmine Treatments.

Agent	Treatment ($\mu\text{g/ml}$)	Survival (%)	Crossing-ver / 10^5 survivors	Gene conversion / 10^5 survivors
4NQO ^c	0	100 (577) ^a	18.0 \pm 0.8 ^b (207) ^a	2.8 \pm 0.4 ^b (33) ^a
	0.5	36.8 (224)	131.5 \pm 28.7 ^{**} (606)	51.5 \pm 11.2 ^{**} (237)
<i>Exponential cells treated in PBS</i>				
Harman	0	100 (395)	39.9 \pm 13.6 (317)	15.0 \pm 2.2 (119)
	100	94.3 (372)	29.6 \pm 9.4 (240)	14.2 \pm 4.8 (107)
	200	80.8 (319)	30.4 \pm 10.1 (250)	14.3 \pm 3.6 (92)
	300	46.7 (184)	49.0 \pm 25.0 (148)	16.7 \pm 4.4 (78)
	400	41.4 (163)	52.3 \pm 16.7 (113)	19.7 \pm 2.3 (60)
Harmine	0	100 (430)	38.2 \pm 9.1 (274)	16.0 \pm 1.2 (137)
	50	99.8 (429)	34.6 \pm 4.3 (292)	14.4 \pm 1.9 (120)
	100	74.5 (320)	38.7 \pm 12.9 (259)	15.2 \pm 2.4 (96)
	150	57.2 (246)	36.9 \pm 4.5 (211)	18.3 \pm 2.8 (102)
	200	37.9 (162)	33.6 \pm 6.0 (150)	19.5 \pm 4.7 (87)
	300	18.1 (78)	33.6 \pm 8.0 (53)	20.9 \pm 7.3 (31)
<i>Cells treated during growth</i>				
Harman	0	100 (610)	35.0 \pm 5.2 (417)	4.2 \pm 0.7 (51)
	100	87.4 (533)	30.1 \pm 0.1 (323)	3.2 \pm 1.7 (35)
	200	82.4 (503)	30.8 \pm 0.9 (286)	3.6 \pm 0.3 (37)
	300	74.8 (456)	40.5 \pm 7.7 (361)	4.8 \pm 1.4 (44)
	400	74.0 (451)	42.0 \pm 9.2 (373)	4.8 \pm 1.1 (44)
Harmine	0	100 (577)	18.0 \pm 0.8 (207)	2.8 \pm 0.4 (33)
	100	84.0 (485)	26.9 \pm 1.0 ^{***} (260)	3.7 \pm 0.7 (36)
	200	80.8 (466)	36.6 \pm 8.4 [*] (335)	4.3 \pm 0.5 [*] (40)
	250	74.7 (431)	48.8 \pm 3.7 ^{***} (419)	4.2 \pm 0.4 [*] (37)
	300	70.4 (406)	56.5 \pm 6.9 ^{***} (452)	7.6 \pm 0.1 ^{***} (61)
	350	22.7 (131)	77.6 \pm 0.1 ^{***} (351)	9.8 \pm 1.3 [*] (45)

^a Numbers in parenthesis are the actual numbers of colonies scored in three plates for each dose; ^b Standard deviation; ^c Positive

control; *Data significant in relation to negative control group (solvent) at $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ / two-tailed Students' t-test.

4. Discussion

The cytotoxic effect of harman and harmine in the yeast *S. cerevisiae* depends on the growth phase of the strains and on the alkaloids' concentration. Both alkaloids were not capable to induce cytotoxic effects in haploid (Table II) and diploid (data not shown) cultures in stationary phase. In contrast, both haploid (Table III) and diploid (Table IV) cells from exponential phase cultures showed a marked cytotoxic effect by harman and harmine treated either in PBS or in growth conditions. Similar results were observed in Chinese hamster lung cells [42] and with *Salmonella typhimurium* cultures [28]. It is possible that the alkaloids' cytotoxicity is related to their ability to intercalate into DNA [10, 30-32]. Harman and harmine both have a tricyclic aromatic structure, only differing in a methoxyl ligand at the C-7 position of harmine (Fig. 1). Their tricyclic aromatic structure enables them to intercalate into double-strand DNA [30-32] and the methoxyl group of harmine is supposed to facilitate this intercalation [31]. The higher cytotoxicity of harmine in exponential phase yeast cultures can probably be attributed to this feature. Also, harmine showed higher toxicity than harman in epimastigotes of two different strains of *Trypanosoma cruzi* [43] and contrary to harman, had *in vitro* cytotoxicity against several human tumor cell lines [44] again suggesting the importance of the methoxyl group for the drug's activity.

Both alkaloids were not mutagenic when cells were treated during growth (Table III). However, harman and harmine apparently caused frameshift mutations when exponentially growing cells were treated in PBS. Our results support those of Picada *et al.* [28] who showed both alkaloids to be weak frameshift mutagens in the *Salmonella*/microsome assay. It is generally agreed that tricyclic and aromatic

intercalating agents such as acridines, induce frameshift mutations in *S. typhimurium* [45]. As harman and harmine have a tricyclic structure similar to that of the known DNA intercalating agent acridine their frameshift mutation inducing activity would be expected.

Frameshift mutations induced by DNA-intercalating drugs have been correlated with DNA strand breaks induced by DNA topoisomerases [46]. Since recombinogenic effects in yeast are best observed in growing cells [47] we would not expect induced recombination in cells of stationary phase. Indeed, both alkaloids showed induction of recombination only under growth conditions (Table IV), although only harmine exhibited statistically significant crossing-over and gene conversion. This again could be explained by harmine being the more efficient DNA intercalator [31]. Funayama *et al.* [21] showed that the β -carboline alkaloids could inhibit DNA topoisomerase I and II. Therefore, the observed mitotic recombination in growing cells might be the result of harmine intercalation-induced DNA strand breaks.

The sensitivity of the recombination-deficient *rad52-1* mutant to both alkaloids suggests a block in the repair of harman and harmine-induced DNA lesions (Fig.2 A). Since *rad52-1* cannot repair DNA single and double-strand breaks induced by ionizing radiations or by alkylating agents [47, 48], we may speculate that both alkaloids directly or indirectly produce the same type of lesions. Similar results were reported for intercalating anti-cancer drugs [46, 49]. The recombinogenic activity of harmine also supports this idea (Table IV). In an earlier report we already showed via the Comet assay that detects DNA strand breaks that harmine produced DNA breakage in mammalian cells [42]. The *rad6 Δ* mutant, which is defective in a step of the yeast error-prone repair pathway, was also sensitive to both alkaloids (Fig.2 B). It is known

that the *RAD6* pathway is also involved in the rejoining of single and double strand breaks induced by mono- and bi-functional alkylating agents [47, 48, 50]. From our data, therefore, we can infer that both alkaloids are probably capable of inducing DNA single and/or double strand breaks. This hypothesis is supported by the DNA damage found by the Comet assay and by the observed chromosome aberrations in Chinese hamster lung cells (V79 cells) after treatment with both alkaloids [42].

Analysis of the interaction between different *rad* mutants with respect to harman and harmine induced DNA damage showed an epistatic interaction between *rad3-e5* and *rad52-1* mutant alleles (Fig. 2 A), whereas a non-epistatic (additive or synergistic) interaction was observed between *rad1Δ* and *rad6Δ* (Fig 2B). This non-epistatic interaction indicates that both excision and error-prone repair may independently be involved in the repair of DNA lesions induced by both alkaloids. This non-epistatic interaction may be also explained by the fact that the alkaloids not only intercalate into DNA, but that both also form DNA adducts [51, 52], so that each repair pathway would preferentially process one type of DNA lesion. On the other hand, the epistatic interaction observed between *rad3-e5* and *rad52-1* mutant alleles implies that some steps of excision and strand break repair may collaborate in the repair of harman and harmine-induced DNA lesions.

Acknowledgements

We thank Dr. Martin Brendel for helpful reading and discussion of the paper. This work was supported by the following Brazilian agencies: CNPq, FAPERGS and GENOTOX/Centro de Biotecnologia/ UFRGS. J. M. Boeira held a CAPES doctoral grant.

References

- [1] J. R. F. Allen, B. R. Holmstedt. The simple β -carboline alkaloids, *Phytochemistry* 19 (1980) 1573-1582.
- [2] Y. Hashimoto, K. Kawanishi, M. Morriyasu. Forensic chemistry of alkaloids. in: *The alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, Vol. 32, Academic Press, San Diego, 1988, pp. 40-45.
- [3] B. Holmstedt. Beta-carbolines and tetrahydroisoquinolines: Historical and ethnopharmacological background, in: F. Bloom, J. Barcha, M. Sandler, E. Usdin (Eds.), *Beta-Carbolines and Tetrahydroisoquinolines*, A R Liss, New York, 1982, pp. 3-13.
- [4] M. A. Collins. Mammalian alkaloids, in: A. Brossi (Eds.), *The alkaloids*, Academic Press, New York, 1983, pp. 329-358.
- [5] T. R. Bosin, K. F. Faull, J. D. Barchas. Harman in alcoholic beverages: Pharmacological and toxicological implications, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 12 (1988) 679-682.
- [6] J. Z. Felton, M. G. Knize. Heterocyclic-amine mutagens/carcinogens in foods, in: C. Cooper, P. Grover (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, 1990, pp. 471-501.

- [7] G. A. Gross, L. B. Turesky, L. B. Fay, W. G. Stillwell, P. L. Skipper, S. R. Tannenbaum. Heterocyclic aromatic amine formation in grilled bacon, beef and fish and grill scrapings, *Carcinogenesis*, 14 (1993) 2313-2318.
- [8] M. M. Airaksinen, I. Kari. β -carbolines, psychoactive compounds in the mammalian body. Part 1: Occurrence, origin and metabolism, *Med. Biol.* 59 (1981) 21-34.
- [9] W. Kuhn, T. Muller, H. Grobe, T. Dierks, H. Rommelspacher. Plasma levels of the β -carbolines harman and norharman in Parkinson's disease, *Acta Neurol. Scand.* 92 (1995) 451-454.
- [10] C. Meester. Genotoxic potential of β -carbolines: a review, *Mutat. Res.* 339 (1995) 139-153.
- [11] W. Zheng, S. Wang, L. F. Barnes, Y. Guan, E. D. Louis. Determination of harmaline and harmine in human blood using reversed-phased high-performance liquid chromatography and fluorescence detection, *Anal. Biochem.* 279 (2000), 125-129.
- [12] J. C. Callaway, L. P. Raymon, W. L. Hearn, D. J. McKenna, C. S. Grob, G. S. Brito, D. C. Mash. Quantitation of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with *ayahuasca*, *J. Analytical Toxicol.* 20 (1996) 492-497.
- [13] J. F. Casale, J. E. Koles. Analysis of ayahuasca ('Santo Daime' [sic]), *Microgram.* 28 (1995) 296-299.

- [14] C. S. Freedland, R. S. Mansbach. Behavioral profile of constituents in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant mixture, *Drug Alcohol Depend.* 54 (1999) 183-194.
- [15] H. Kim, S. O. Sablin, R. R. Ramsay. Inhibition of monoamine oxidase A by β -carboline derivatives, *Arch. Biochem. Biophys.* 337 (1997) 137-142.
- [16] D. J. Tweedie, R. A. Prough, M. D. Burke. Effects of induction on the metabolism and cytochrome P-450 binding of harmaline and other β -carbolines, *Xenobiotica* 18 (1988) 785-796.
- [17] M. M. Airaksinen, E. Mikkonen. Affinity of β -carbolines on rat brain benzodiazepine and opiate binding sites. *Med. Biol.* 58 (1980) 341-344.
- [18] H. Rommelspacher, C. Nanze, H. O. Borbe, K. J. Fehske, W. E. Müller, U. Wollert. Benzodiazepine antagonism by harmaline and other β -carbolines in vitro and in vivo, *Eur. J. Pharmacol.* 70 (1981) 409-416.
- [19] R. A. Glennon, M. Dukat, B. Brella, S-S. Hong, L. Costantino, M. Teitler, C. Smith, C. Egan, K. Davis, M. V. Mattson. Binding of β -carbolines and related agents at serotonin (5-HT_2 and 5-HT_{1A}), dopamine (D_2) and benzodiazepines receptors, *Drug Alcohol Depend.* 60 (2000) 121-132.
- [20] R. A. Glennon. Serotonin receptor interactions of harmaline and several related β -carbolines, *Life Sci.* 29 (1981) 862-865.

- [21] Y. Funayama, K. Nishio, K. Wakabayashi, M. Nagao, K. Shimoi, T. Ohira, S. Hasegawa, N. Saijo. Effects of β - and γ -carboline derivatives on DNA topoisomerase activities, *Mutat. Res.* 349 (1996) 183-191.
- [22] M. Nakayasu, F. Nakasato, H. Sakamoto, M. Terada, T. Sugimura. Mutagenic activity of norharman and harman in Chinese lung cells in assay with diphtheria toxin resistance as a marker, *Cancer Lett.* 17 (1983) 249-255.
- [23] E. Madle, G. Obe, J. Hansen, H. Ristow. Harman and norharmane: induction of sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes in vitro and interaction with isolated DNA, *Mutat. Res.* 90 (1981) 433-442.
- [24] Y. F. Sasaki, H. Yamada, K. Shimoi, N. Kinae, I. Tomita, H. Matsumura, T. Ohta, Y. Shirasu. Enhancing effects of heterocyclic amines and β -carbolines on the induction of chromosome aberrations in culture mammalian cells, *Mutat. Res.* 269 (1992) 79-95.
- [25] M. J. Hazen, M. G. Gutiérrez-González. UV-mediated toxic bioactivity of harmine in the meristematic cells of *Allium cepa*, *Mutagenesis* 3 (1988) 333-337.
- [26] K. Umezawa, A. Shirai, T. Matsushima, T. Sugimura. Comutagenic effect of norharman and harman with 2-acetylaminofluorene derivatives, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* 75 (1978) 928-930.

- [27] M. Riebe, K. Westphal, H. Keller. Test-condition-dependent influence of harman and norharman on benzo(a)pyrene mutagenesis in *Salmonella*, *Mutat. Res.* 104 (1982) 9-15.
- [28] J. N. Picada, K. V. C. L. da Silva, B. Erdtmann, A. T. Henriques, J. A. P. Henriques. Genotoxic effects of structurally related β -carbolines alkaloids, *Mutat. Res.* 379 (1997) 135-149.
- [29] Y. Oda, S-I. Nakamura, I. Oki. Harman and norharman induce SOS responses and frameshift mutations in bacteria, *Mutat. Res.* 208 (1988) 39-44.
- [30] G. Duportail. Linear and circular dichroism of harmine and harmaline interacting with DNA, *Int. J. Biol. Macromol.* 3 (1981) 188-193.
- [31] Z. Taira, S. Kanzawas, C. Dohara, S. Ishida, M. Matsumoto, Y. Sakiya. Intercalation of six beta-carboline derivatives into DNA, *Jpn. J. Toxicol. & Environ. Health* 43 (1997) 83-91.
- [32] M. Balón, M. A. Muñoz, C. Carmona, P. Guardado, M. Galán. A fluorescence study of the molecular interactions of harmane with the nucleobases, their nucleosides and mononucleotides, *Biophys. Chem.* 80 (1999) 41-52.
- [33] J. F. Remsen, P. A. Cerutti. Inhibition of DNA-repair and DNA synthesis by harman in human alveolar tumor cells, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 86 (1979) 124-129.

- [34] J. Ashby, D. Paton. The influence of chemical structure on the extend and sites of carcinogens and 55 different human carcinogen exposures, *Mutat. Res.* 286 (1993) 3-74.
- [35] I. Machida, S. Nakai. Induction of spontaneous and UV-induced mutations during commitment to meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutat. Res.* 73 (1980) 59-68.
- [36] J. A. P. Henriques, K. V. C. L. Da Silva, E. Moustacchi. Interaction between genes controlling sensitivity to psoralen (pso) and to radiation (rad) after 3-carbethoxypsoralen plus 365 nm UV light treatment in yeast, *Mol. Gen. Genet.* 201 (1985) 415-420.
- [37] S. Snow. Absence of suppressible alleles at the *his 1* locus of yeast, *Mol. Gen. Genet.* 164 (1978) 341-342.
- [38] D. C. Hawthorne. Identification of nonsense codons in yeast, *J. Mol. Biol.* 43 (1969) 71-75.
- [39] D. C. Hawthorne, R. K. Mortimer. Suppressors in yeast, *Genetics* 48 (1963) 617-620.
- [40] R. C. Von Borstel, K. T. Cain, C. M. Steinberg. Inheritance of spontaneous mutability in yeast, *Genetics* 69 (1971) 17-27.

- [41] R. C. Schuller, R. C. Von Borstel. Spontaneous mutability in yeast. I. Stability of lysine reversion rates to variation of adenine concentration, *Mutat. Res.* 24 (1974) 17-23.
- [42] J. M. Boeira, J. da Silva, B. Erdtmann, J. A. P. Henriques. Genotoxic effects of the alkaloids harman and harmine assessed by Comet assay and chromosome aberration test in mammalian cells *in vitro*, *in press* in *Pharmacol. Toxicol.*
- [43] P. Rivas, B. K. Cassels, A. Morello, Y. Repetto. Effects of some β -carboline on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes, *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 122 (1999) 27-31.
- [44] J. Ishida, H-K. Wang, K. F. Bastow, C-Q. Hu, K-H. Lee. Antitumor agents 201. Cytotoxicity of harmine and related β -carboline analogs, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9 (1999) 3319-33-24.
- [45] E. C. McCoy, E. J. Rosenkranz, L. A. Petrullo, H. S. Rosenkranz. Frameshift mutations: relative roles of simple intercalation and of adduct formation, *Mutat. Res.* 90 (1981) 21-30.
- [46] M. S. Pasqual, C. P. Lauer, P. Moyna, J. A. P. Henriques. Genotoxicity of the isoquinoline alkaloid berberine in prokaryotic and eukaryotic organisms, *Mutat. Res.* 286 (1993) 243-252.

- [47] E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede. DNA repair and mutagenesis, ASM Press, Washington, U. S. A, 1995.
- [48] C. E. Nickoloff, M. F. Hoekstra. DNA damage and repair, Human Press, Totowa, New Jersey, U. S. A., 1998.
- [49] E. Moustacchi, V. Favaudon, E. Bisagni. Likelihood of the new antitumoral drug 10-(dimethylaminopropylamino)-6 methyl-5H-pyrido(3',4": 4,5)pyrrolo-[2,3-g]-isoquinoline (BD-40), a pyridopyrroloisoquinoline derivative, to induce DNA strand breaks in vivo and its non mutagenicity in yeast, *Cancer Res.* 43 (1983) 3700-3706.
- [50] M. Brendel, N. A. Khan, R. H. Haynes. Common steps in the repair of alkylation and radiation damage in yeast, *Mol. Gen. Genet.* 106 (1970) 289-295.
- [51] K. Yamashita, H. Ohgaki, K. Wakabayashi, M. Nagao, T. Sugimura. DNA adducts formed by the comutagens harman and norharman in various tissues of mice, *Cancer Lett.* 42 (1988) 179-183.
- [52] K. Wakabayahi, Y. Totsuka, K. Fukutome, A. Oguri, H. Ushiyama, T. Sugimura. Human exposure to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines and comutagenic β -carbolines, *Mutat. Res.* 376 (1997) 253-259.

III - CAPÍTULO II

**Genotoxic Effects of the Alkaloids Harman and Harmine
Assessed by Comet Assay and Chromosome Aberration Test
in Mammalian Cells *in vitro***

(Aceito para publicação na *Pharmacology & Toxicology*)

**Genotoxic Effects of the Alkaloids Harman and Harmine
Assessed by Comet Assay and Chromosome Aberration Test
in Mammalian Cells *in vitro***

Jane M. Boeira¹, Juliana da Silva², Bernardo Erdtmann² and João A. P. Henriques^{1,*}

¹ Department of Biophysics / Biotechnology Center - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

² Departament of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

***Address for Correspondence:** Biotechnology Center, UFRGS; Av. Bento Gonçalves,
9500, Prédio 43421; Campus Do Vale; P. O. Box 15005; CEP 91501-970, Porto Alegre,
RS, Brazil; Fax.: 00 55 51 316 60 84; E-mail: pegas@dna.cbiot.ufrgs.br

Running Title: Genotoxic effects of Harman and Harmine

Abstract: Harman and harmine are β -carboline alkaloids which are present in plants widely used in medical practice, in beverages used for religious purposes in Brazil, as well as in tobacco smoke and over cooked food. In view of the controversial results observed in the literature about the mutagenic effects of these alkaloids, we studied their cytotoxic and genotoxic effects in V79 Chinese hamster lung fibroblasts *in vitro* using single-cell gel assay, Comet assay, either in the presence or in absence of an exogenous metabolic activation system (S9-mix), and by the chromosome aberration test without S9-mix. Harmine was more cytotoxic than harman. Both harman and harmine increased aberrant cell frequency and induced DNA damage by Comet assay. These results suggest that harman and harmine are genotoxic in V79 cells, probably as a consequence of their ability to induce DNA strand breaks.

Keywords: Harman, Harmine, Comet Assay, Chromosome Aberrations, V79 cells

Introduction

Harman and harmine are β -carboline alkaloids widely distributed in plants such as *Banisteriopsis spp* and *Tetrapteris spp* (Malpighiaceae), *Virola spp* (Myristicaceae) and *Anadenanthera spp* (Leguminosae) (Allen & Holmstedt 1980; Bruneton 1991). *Passiflora spp* (Passifloraceae), popularly known as maracujás, which contain harman, are plants widely used in medical practice in Brazil, mainly for their anti-spasmodic and sedative properties (Hashimoto *et al.* 1988). In addition to natural occurrence, harman has also been found in tobacco smoke and over cooked foods rich in proteins (meat or fish products), reflecting its formation from tryptophan by pyrolysis (Bruneton 1991; Gross *et al.* 1993; Totsuka *et al.* 1999). Alcoholic beverages like wine, beer, sake, or whisky contain detectable amounts of harman that range from 0.1 to 8.5 ng/ml (Adachi *et al.* 1991). Harman is also present in the human body; it has been isolated from various biological liquids and tissues, e.g., blood platelets, milk, urine, brain, liver, kidney and lens, and is thought to originate from the condensation of tryptamine and acetaldehyde (Airaksinen & Kari 1981; Meester 1995; Zheng *et al.* 2000). Harmine has been found in human plasma at 10 to 250 ng/ml after the ingestion of "ayahuasca" (Callaway *et al.* 1996), a beverage that is used for religious purposes in Brazil. These are teas made from mixtures of plants such as *Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*, that cause a variety of psychoactive effects (Casale & Koles 1995).

Both alkaloids have been of interest for some time because they evoke a variety of responses in biological systems (Meester 1995). These β -carboline alkaloids, induce mutagenic effects in various organisms such as: *Salmonella typhimurium* (Wehner *et al.* 1979; Oda *et al.* 1988; Picada *et al.* 1997); *Escherichia coli* (Oda *et al.* 1988; Picada *et*

al. 1997); Chinese hamster lung cells (Nakayasu *et al.* 1983); human peripheral lymphocytes (Madle *et al.* 1981) and *Saccharomyces cerevisiae* (Boeira *et al. in prep.*). Their activities in prokaryotic and eukaryotic cells have been attributed in part to the ability to react with DNA by intercalation (Meester 1995; Taira *et al.* 1997; Balon *et al.* 1999). However, both alkaloids decreased the frequency of cells damage when associated with several mutagenic agents (Levitt *et al.* 1977; Wakabayashi *et al.* 1982; Sasaki & Shirasu 1993). They were also unable to induce significant genotoxic effects in the same organisms where positive results were observed (Nagao *et al.* 1977; Sasaki *et al.* 1992; Picada *et al.* 1997; Boeira *et al. in prep.*).

In view of these controversial results this study was undertaken to determine the effects of these compounds in V79 cells. Harman and harmine were evaluated for their genotoxicity in V79 Chinese hamster lung cells *in vitro* using chromosome aberration test without metabolic activation (S9-mix), and the alkaline single-cell gel, Comet assay, either in the presence or in the absence of S9-mix.. The chromosome aberration is a classical cytogenetic method which detects chromosome damage induced by various chemicals as base analogues, alkylating and intercalating agents. The final lesions responsible for aberrations are DNA strand breaks (Palitti 1998; Somorovska *et al.* 1999). The alkaline Comet assay is a genotoxicity test, which detects DNA strand breaks, alkali-labile sites and incomplete excision repair events in individual cells. It is a rapid and sensitive method for the detection of DNA damage induced *in vitro* or *in vivo* by various agents in a variety of mammalian cells (Fairbairn *et al.* 1995; Hartmann & Speit 1997). In summary, harman and harmine were evaluated by chromosome aberration test and Comet assay and their possible relation to DNA strand breaks.

Materials and Methods

Chemicals: Harman (CAS 21655-84-5; purity not specified) and harmine (CAS 343-27-1; approx. 98 % purity) hydrochloride (Fig. 1), cyclophosphamide (CP) and methylmethanesulphonate (MMS) were purchased from Sigma Chemical CO (St Louis MO). The Aroclor 1254-induced S9 liver fraction was acquired from Molecular Toxicology Incorporation (MOLTOX, Annapolis, USA).

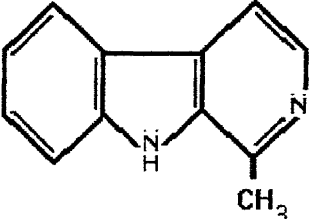
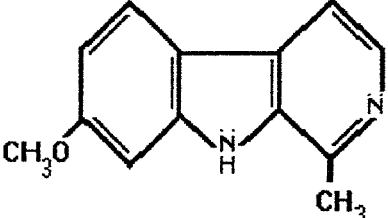
Alkaloid	Chemical name	Chemical structure
Harman	1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole	
Harmine	7-methoxy-1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole	

Figure 1. Nomenclature and structural formula of the harman and harmine alkaloids.

For the treatment of cells, 2 mg/ml stock solutions of both alkaloids were prepared immediately prior to use. Harmine was dissolved in distilled water and harman in dimethylsulfoxide (DMSO) plus distilled water, the final concentration of DMSO in the incubation mixture was 0.2 %. The appropriate concentrations of alkaloids were obtained by dilution from the stock solutions in distilled water or Minimum Essential Medium (MEM) complete medium. MMS and CP were dissolved

in Hanks Salt Solution. S9-mix was prepared by adding 10 mM glucose-6-phosphate and 5 mM NADP (both Boehringer Mannheim) to S9 fraction from liver homogenate of Aroclor 1254-induced rats. The final concentration of S9-mix in the incubation mixtures was 3 % (~ 1 mg protein/ml).

Treatment of cells: Chinese hamster lung fibroblasts (V79 cells) were cultivated under standard conditions in MEM with Earle's salts, supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine and antibiotics (Speit *et al.* 1994). Cells were maintained in tissue culture flasks (Nunc, 25 cm²) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂ and were harvested by treatment with 0.15 % trypsin and 0.08 % EDTA in phosphate-buffered saline (PBS). 2x10⁵ cells were seeded into each flask and cultured for 1 day prior to treatment with the test substances. The cells were treated for 2 h for the Comet assay, or 3 h for chromosome aberrations with the test substance. The culture flasks were protected from direct light during treatment with the alkaloids.

Plating efficiency: The concentrations used for each sample were based on plating efficiency, which was determined as described by Hartmann & Speit (1997). Two hundred cells were grown overnight in four replicate culture flasks. The cells were treated for 3 h with the test substances without S9-mix, washed with PBS solution and cultivated for seven days. Colonies were fixed with methanol and acetic acid (3:1), stained with crystal violet (1 %) and counted. Plating efficiencies of treated cultures were related to untreated controls (relative plating efficiency). The dose was considered cytotoxic when cell survival was < 70 %.

Chromosome aberration test: Three experiments were carried out to determine the effects of both alkaloids on the induction of chromosomal aberrations (CA) in V79 cells (Table 2). About 2×10^5 cells were treated for 3 h without S9-mix. After 16h, colchicine (5 $\mu\text{g/ml}$) was added for 2 h. Chromosomes were prepared according to standard procedures. Hypotonic treatment with 0.4 % KCl (37°C) was applied for 20 min. The cells were fixed with methanol and acetic acid (3:1) and the fixative was changed twice. Air dried slides were stained with Giemsa (5 %) and scored for chromosome aberrations according to Savage (1975) and IAEA (1986). Gaps cells were also recorded, but not considered for the evaluation of mutagenicity. MMS (4.0×10^{-4} M) was used as a positive control. Only well-spread metaphases were observed. 150 metaphases per culture were analyzed for the presence of chromosomal aberrations. The mitotic index was determined for 3,000 cells and given as number of mitoses per 100 cells (%). The statistical evaluation was the same as in the Comet assay.

Comet assay: The alkaline Comet assay was performed as described by Singh *et al.* (1988) with minor modifications (Hartmann & Speit 1997). At the end of the treatment, cells were washed with ice-cold PBS and trypsinized with 100 μl trypsin (0.15 %). After 30 sec, 100 μl complete medium was added and the cells were gently resuspended. Immediately after, 20 μl of cells suspension ($\sim 10^6$ cells/ml) were dissolved in 0.75 % low melting point agarose (LMA) and spread on agarose-precoated microscope slides. The cells were lysed (2.5M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris, pH 10.0, with freshly added 1 % Triton X-100 and 10 % DMSO) for a minimum of 1 h and a maximum of 2 weeks at 4°C and were placed in a horizontal electrophoresis box,

containing freshly made alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH ~13.0) for 20 min at 4°C. An electric current of 300 mA and 25 V (0.90 V/cm) was applied for 15 min to electrophorese the DNA. The slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), stained with ethidium bromide (20 µg/ml) and analyzed using a fluorescence microscope. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed per group. Analysis was performed by measuring the length of DNA migration (nuclear region + tail) in arbitrary units using a calibrated ocular scale. One unit was approximately 5 µm at 200 × magnification. Cells were also scored visually into five classes, according to tail size (from undamaged-0, to maximally damaged-4), and a value (damage index - DI) was assigned to each comet according to its class. DI thus ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells x 4) (Collins *et al.* 1995, 1997; Silva *et al.* 2000a). The damage frequency (%) was calculated based on number of cells with tails vs. those without. Results are presented as mean and range of four independent experiments. The statistical evaluation was by the two-tailed Students' t-test. A difference of $P < 0.05$ was considered statistically significant. CP (1.5×10^{-5} M) and MMS (4.0×10^{-5} M) were used as positive control with and without metabolic activation, respectively. MMS at this dose was also tested in combination with the highest dose of the alkaloids to check any possible modulating effect.

Results

Relative plating efficiency: Figure 2 shows the relative survival of V79 cells after treatment with alkaloids harman and harmine for 3 h, without S9-mix. It can be seen

that both compounds exert a cytotoxic effect on V79 cells. Harman reduced the relative survival at 150 $\mu\text{g/ml}$ to 22 %, while harmine at 50 $\mu\text{g/ml}$ led to 68 %, and at 80 $\mu\text{g/ml}$ to 3 % survival. Thus harmine was more cytotoxic than harman by a factor of approximately 2.5 at the 30% survival level.

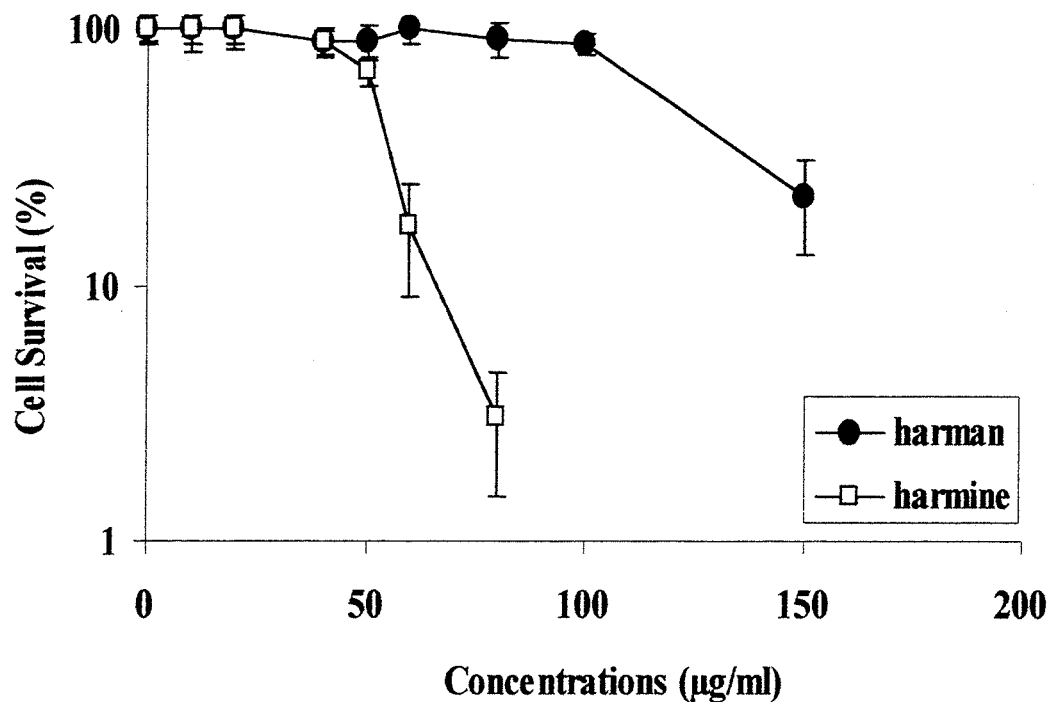


Figure 2. Cell survival of V79 cells after exposure to harman and harmine for 3 h in absence of metabolism.

Chromosome aberrations: Three experiments were carried out to determine the effects of both alkaloids on the induction of chromosomal aberrations (CA) in V79 cells (Table 1). A significant increase of CA was obtained for cultures treated with harman at 40 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0.001$) and 80 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0.05$). Harman significantly reduced the mitotic

index at 60 µg/ml and 100 µg/ml doses. For cultures treated with harmine, CA increased significantly at all doses ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) except at 50 µg/ml, which was toxic, and the culture showed very poor cell growth rendering chromosome analysis impossible.

Comet assay: Table 2 shows the effects of both alkaloids on image length (IL), damage index (DI) and damage frequency (DF), as measured by DNA damage in V79 cells according to the SCG test, in the presence and absence of metabolization (S9-mix). Harman and harmine clearly show a significant increase in the means of DI and DF at all concentrations in relation to control groups. The mean IL was significant only when MMS (4×10^{-5} M) was added to the highest harman (80 µg/ml) and harmine (40 µg/ml) concentrations. Only harman showed a difference between presence and absence of metabolic activation. We observed an increase of DI for all doses when the cells were not treated with S9-mix, but this difference was significant only at 40 µg/ml ($P < 0.05$). In contrast, harmine did not differ in treatments with and without metabolization. When the highest harman dose was added to MMS, in the absence of S9-mix, the DI was slightly increased in relation to the control. In contrast, the DI was slightly decreased when the highest harmine dose was added to MMS. Figure 3 shows the extent of DNA damage, analyzed using a SCG test (classes 0-4). The frequency of damage classes was different for each alkaloid for each dose. All doses for harman and harmine show more than 10 % "comets". Class 4 was observed above 10 % for V79 cells at the doses 10 µg/ml (with and without S9-mix) and 20 µg/ml (without S9-mix) for harmine. For harman, the doses 40 µg/ml (without S9-mix) and 80 µg/ml (with and without S9-mix) showed more than 10 % class 4.

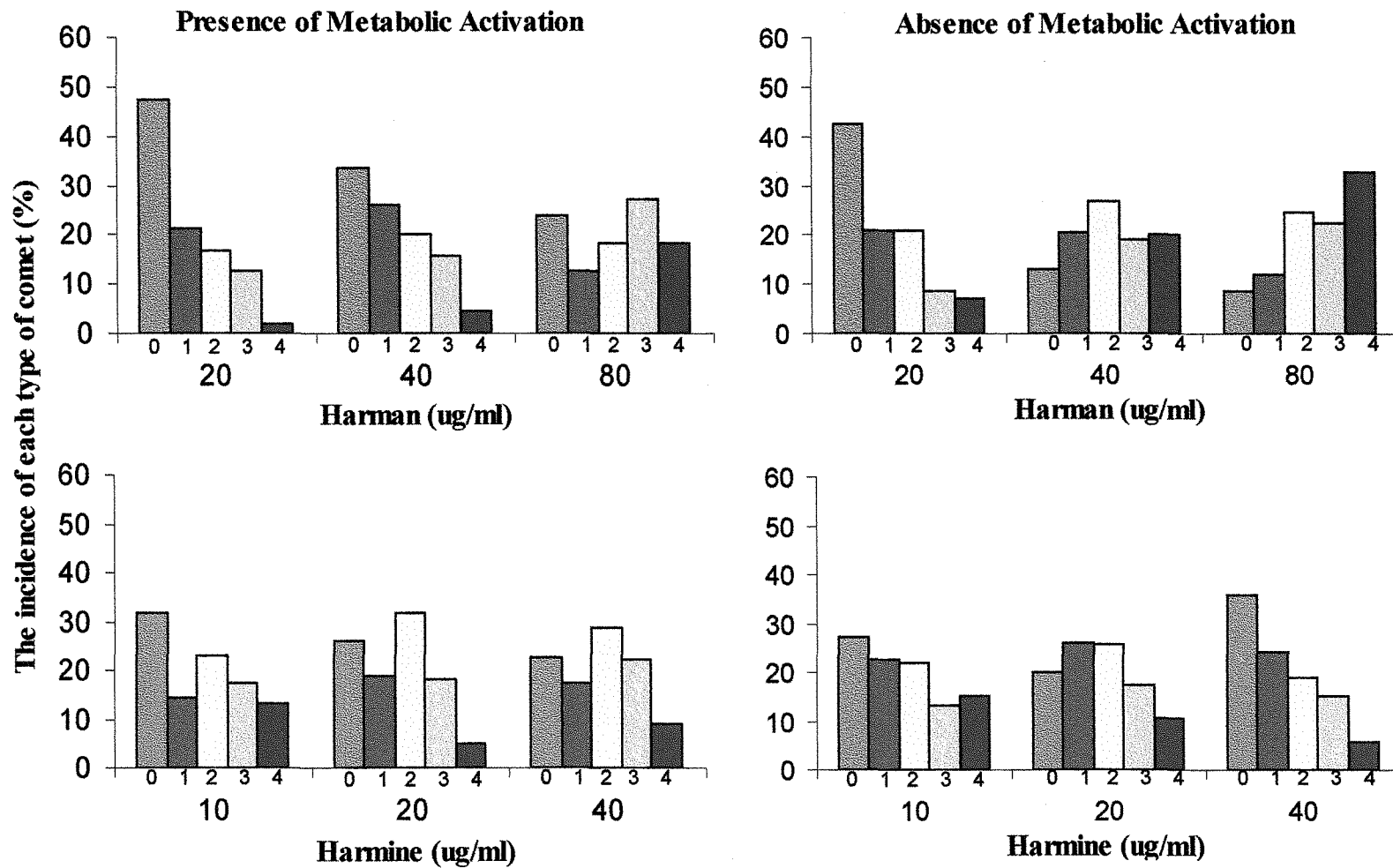


Figure 3. The distribution of damage classes (0 – undamaged to 4 – maximum damage) of V79 cells, by Comet assay, in the presence and absence of S9-mix after harman and harmine treatments at different concentrations. Frequency was calculated for 100 cells per treatment.

TABLE 1. Frequencies of chromosomal aberrations in V79 cells after 3 h treatment with harman and harmine, in absence of S9-mix. Three experiments (Exp.) were performed for each dose.

Substance	Treatment	Exp.	Mitotic Index ^b		Number of Aberrations ^c						Aberrant Cells ^d	
			%	Mean ± SD	DIC	R	B'	B''	E''	G	%	Mean ± SD
MMS ^a	4x10 ⁻⁴ M	1	3.1		0	2	3	2	4	6	7.3	
		2	3.3	3.3 ± 0.3	0	0	6	2	1	9	5.3	6.0 ± 1.1***
		3	3.6		0	1	1	4	2	5	5.3	
HARMAN	0	1	3.4		0	0	0	0	1	1	0.7	
		2	3.5	3.7 ± 0.4	0	0	0	0	0	1	0.0	0.5 ± 0.4
		3	4.1		0	0	1	0	0	0	0.7	
	40 µg/ml	1	3.4		1	2	0	0	1	1	2.7	
		2	3.6	3.3 ± 0.4	2	1	0	0	1	0	2.7	2.7 ± 0.0***
		3	2.9		0	0	2	0	2	1	2.7	
	60 µg/ml	1	2.7		1	1	1	0	1	0	2.7	
		2	1.4	2.1 ± 0.7*	0	2	0	1	1	0	2.7	1.8 ± 1.5
		3	2.2		0	0	0	0	0	1	0.0	
	80 µg/ml	1	2.5		0	0	0	0	2	1	1.3	
		2	2.8	2.9 ± 0.4	0	1	0	1	2	0	2.7	2.0 ± 0.7*
		3	3.3		1	0	0	0	1	2	2.0	
	100 µg/ml	1	2.4		1	0	0	1	3	0	2.7	
		2	2.3	2.3 ± 0.1**	0	0	0	1	1	0	1.3	1.6 ± 1.0
		3	2.2		0	0	0	0	1	1	0.7	
HARMINE	0	1	4.1		0	0	0	1	0	1	0.7	
		2	2.6	3.9 ± 1.3	0	0	0	0	0	0	0.0	0.2 ± 0.4
		3	5.1		0	0	0	0	0	0	0.0	
	20 µg/ml	1	2.1		2	1	0	2	0	0	3.3	
		2	3.6	2.7 ± 0.8	1	0	1	1	1	2	2.7	2.4 ± 1.0*
		3	2.5		0	0	0	1	1	0	1.3	
	30 µg/ml	1	3.3		1	2	0	1	3	0	4.7	
		2	2.3	2.5 ± 0.8	0	2	1	0	0	0	2.0	3.1 ± 1.4*
		3	1.8		1	1	0	1	1	1	2.7	
	40 µg/ml	1	2.1		0	1	0	1	2	0	2.7	
		2	2.1	2.0 ± 0.1	1	0	0	0	3	1	2.7	2.5 ± 0.4**
		3	1.9		0	0	0	0	3	0	2.0	
	50 µg/ml ^e	1	- ^e		0	0	0	0	0	0	- ^e	
		2	- ^e	-	0	0	0	0	1	0	- ^e	-
		3	- ^e		0	0	0	0	0	0	- ^e	

^a positive control; ^b frequency per experiment and mean and standard deviation, in 3,000 metaphases scored; ^c number of aberrations per 150 metaphases analysed; ^d frequency per experiment and mean and standard deviation of aberrant cells excluding gaps; ^e toxic; DIC: dicentric chromosomes; R: ring chromosomes; B': chromosome breaks; B'': chromatid breaks; E'': chromatid exchanges; G: gaps (chromosome and chromatid); * data significant in relation to control (solvent) group at $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ / two-tailed Students' t-test.

TABLE 2. Effect of alkaloids harman and harmine in V79 cells exposed for 2 hours and evaluated by Comet Assay in presence (+) and absence (-) of metabolic activation.

Substance	Treatment	S9 mix	Image length (μm) ^b	Damage index ^b	Damage frequency (%) ^b
MMS ^a	4.0x10 ⁻⁵ M	-	50.7 ± 10.1 ^c	303.0 ± 42.1 ^c	97.2 ± 1.9 ^c
CP ^a	1.5x10 ⁻⁵ M	+	40.5 ± 10.4 ^c	207.7 ± 12.0 ^c	86.7 ± 6.0 ^c
HARMAN	0	-	27.5 ± 6.5	45.5 ± 16.7	24.7 ± 9.3
	20 $\mu\text{g/ml}$	-	35.8 ± 11.1	117.0 ± 44.6*	57.5 ± 11.5**
	40 $\mu\text{g/ml}$	-	39.5 ± 11.2	212.5 ± 32.8***	86.7 ± 5.9***
	80 $\mu\text{g/ml}$	-	41.8 ± 11.2	258.7 ± 54.0***	91.5 ± 8.1***
	80 $\mu\text{g/ml}$ + MMS	-	53.3 ± 7.8**	345.3 ± 18.0***	98.7 ± 2.5***
	0	+	27.1 ± 7.1	32.5 ± 9.9	14.0 ± 3.2
	20 $\mu\text{g/ml}$	+	32.0 ± 8.9	100.0 ± 19.3***	52.5 ± 11.2***
	40 $\mu\text{g/ml}$	+	34.3 ± 9.7	131.2 ± 19.2***	66.5 ± 9.3***
	80 $\mu\text{g/ml}$	+	40.3 ± 11.6	203.8 ± 39.1***	76.3 ± 11.9***
	HARMINE	0	-	26.5 ± 4.8	21.0 ± 3.9
10 $\mu\text{g/ml}$		-	37.6 ± 11.8	167.0 ± 31.6***	73.0 ± 12.1***
20 $\mu\text{g/ml}$		-	37.7 ± 11.1	172.7 ± 22.2***	80.0 ± 8.9***
40 $\mu\text{g/ml}$		-	36.9 ± 9.6	131.0 ± 45.8**	64.2 ± 15.2***
40 $\mu\text{g/ml}$ + MMS		-	44.5 ± 11.4*	250.7 ± 20.2***	94.7 ± 5.2***
0		+	26.4 ± 4.6	20.5 ± 4.8	11.5 ± 1.7
10 $\mu\text{g/ml}$		+	37.4 ± 11.3	166.0 ± 25.0***	68.2 ± 4.8***
20 $\mu\text{g/ml}$		+	36.2 ± 9.8	157.0 ± 16.5***	73.7 ± 6.7***
40 $\mu\text{g/ml}$		+	37.9 ± 10.3	178.0 ± 19.2***	77.3 ± 5.9***

^a positive control; ^b mean values and standard deviation obtained from average of 100 cells per experiment – total of four experiments per dose for each substance; ^c data significant in relation to both control (solvents) groups at $P < 0.05$; * data significant in relation to control (solvent) group at $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ / two-tailed Students' t-test.

TABLE 3. Genotoxic effects of harman and harmine alkaloids.

HARMAN			HARMINE		
<i>Test system used</i>	R ^a	<i>Reference</i>	<i>Test system used</i>	R ^a	<i>Reference</i>
▫ <i>S. Typhimurium</i>			▫ <i>S. Typhimurium</i>		
SOS response: TA1535/pSK1002: -S9	+	Oda <i>et al.</i> 1988	Salmonella/microsome assay:		
Salmonella/microsome assay:			TA98 (Frameshift mutation): -S9	-	Picada <i>et al.</i> 1997
TA98 (Frameshift mutation): -S9	-	Picada <i>et al.</i> 1997	+ S9	+	Picada <i>et al.</i> 1997
+ S9	-	Nagao <i>et al.</i> 1977; Picada <i>et al.</i> 1997	TA97 (Frameshift mutation): -S9	-	Picada <i>et al.</i> 1997
TA97 (Frameshift mutation): -S9	+	Picada <i>et al.</i> 1997	+ S9	±	Picada <i>et al.</i> 1997
+ S9	±	Picada <i>et al.</i> 1997	TA100 (Base pairs substitution): -S9	-	Picada <i>et al.</i> 1997
TA100 (Base pairs substitution): -S9	-	Picada <i>et al.</i> 1997	+ S9	-	Picada <i>et al.</i> 1997
+ S9	-	Picada <i>et al.</i> 1997	TA102 (Base pair substitution, excision ⁺ , oxidative damage, alkylating and crosslinks agents): -S9	±	Picada <i>et al.</i> 1997
TA102 (Base pair substitution, excision ⁺ , oxidative damage, alkylating and crosslinks agents): -S9	±	Picada <i>et al.</i> 1997	+ S9	±	Picada <i>et al.</i> 1997
+ S9	±	Picada <i>et al.</i> 1997	TA1537 (Frameshift mutation): +S9	±	Wehner <i>et al.</i> 1979
▫ <i>E. coli</i> :			▫ <i>E. coli</i> :		
AB1157/his4 reversion: -S9	-	Oda <i>et al.</i> 1988	SOS response/ PQ37: -S9	-	Picada <i>et al.</i> 1997
KMBL3835 (Frameshift mutation) -S9	+	Oda <i>et al.</i> 1988	+ S9	-	Picada <i>et al.</i> 1997
SOS response: PQ37: -S9	+	Picada <i>et al.</i> 1997	▫ Chinese hamster cells:		
+ S9	-	Picada <i>et al.</i> 1997	Mutation (diphtheria toxin resistance) / CLS: -S9	+	Nakayasu <i>et al.</i> 1983
▫ Chinese hamster cells:			Chromosome aberration/ CHO-K1: -S9	-	Sasaki <i>et al.</i> 1992
Mutation (diphtheria toxin resistance) / CLS: -S9	+	Nakayasu <i>et al.</i> 1983	+ S9	-	Sasaki <i>et al.</i> 1992
Chromosome aberration/ CHO-K1: -S9	-	Sasaki <i>et al.</i> 1992	V79 (Comet assay) :-S9	+	Present study
+ S9	-	Sasaki <i>et al.</i> 1992	+ S9	+	Present study
V79 (Comet assay) :-S9	+	Present study	V79 (chromosome aberration) -S9	±	Present study
+ S9	+	Present study	▫ Human peripheral lymphocytes:		
V79 (chromosome aberration) -S9	±	Present study	Sister-chromatid exchange: -S9	+	Madle <i>et al.</i> 1981
▫ Human peripheral lymphocytes:			▫ Human lymphoblastoid cells/NL3:		
Sister-chromatid exchange: -S9	+	Madle <i>et al.</i> 1981	Sister-chromatid exchange: -S9	±	Tohda <i>et al.</i> 1983
▫ Human lymphoblastoid cells/NL3:			+ S9	±	Tohda <i>et al.</i> 1983
Sister-chromatid exchange: -S9	±	Tohda <i>et al.</i> 1983	▫ Mice		
+ S9	±	Tohda <i>et al.</i> 1983	Micronucleus test	±	Picada <i>et al.</i> 1997
▫ Mice			▫ <i>S. cerevisiae</i>		
Micronucleus test	±	Picada <i>et al.</i> 1997	XV185-14c (frameshift, forward, point mutation): -S9	+	Boeira <i>et al. in prep</i>
▫ <i>S. cerevisiae</i>			XS2316 (gene conversion, crossing over): -S9	+	Boeira <i>et al. in prep</i>
XV185-14c (frameshift, forward, point mutation): -S9	+	Boeira <i>et al. in prep</i>			
XS2316 (gene conversion, crossing over): -S9	-	Boeira <i>et al. in prep</i>			

^a, Result; -S9, without metabolic activation; +S9, with metabolic activation; +, positive; -, negative; ±, signs of positivity.

Discussion

The cytotoxic effect of both β -carboline alkaloids harman and harmine in V79 Chinese hamster lung cells depends on the alkaloid concentration. Harmine caused the most pronounced effect (Fig. 2). Similar results were shown in CHO-K1 cells (Chinese hamster ovary cells; Sasaki *et al.* 1992) and in *Salmonella typhimurium* cultures (Picada *et al.* 1997) treated with both alkaloids at similar doses.

The chromosome aberration test (CA) is a sensitive and valuable technique to observe cytogenetic damage. The results of the CA are in agreement with our cytotoxic data, where the highest doses of harman and harmine demonstrated toxic effects. Harman showed a reduced mitotic index and harmine a reduced number of cells for chromosome analysis. The CA shows that these alkaloids, in the absence of a metabolic activation system, are able to induce significant strand breaks at different doses, although they do not demonstrate a clear dose-dependent effect. Although these compounds induced chromosome damage in mammalian cells, they must be considered weak clastogenic agents. Data in the literature about the genotoxic effect of the harman and harmine alkaloids are controversial as summarized in Table 3. Our data were in agreement with those previously described by Thoda *et al.* (1983) in human lymphoblastoid (NL3) cells in the absence of metabolic activation, which showed weak SCE-inducing activity. Picada *et al.* (1997) using bone marrow micronuclei assay in mice for harman and harmine did also demonstrate an increase, although not significant, of chromosome damage. In contrast, Sasaki *et al.* (1992) observed that both harman and harmine do not induce chromosome aberrations by themselves in CHO-K1 cells. In their study, harman

and harmine were used at doses greater than the present study. The difference in the results, in similar doses could indicate that V79 strain, Chinese hamster lung cells, was more sensitive to determine CA to both compounds than CHO-K1 strain, Chinese hamster ovary cells. There are differences in the sensibility of each test and in relation to the complexity of each line and organism used. Speit *et al.* (1994) also found differences in genotoxicity tests using two V79 sub-lines. These controversial results indicate that differences between some lines may occur, which significantly influence the results of genotoxicity tests (Speit *et al.* 1994).

The Comet assay (SCG) shows a significant increase of DNA damage index and damage frequency for both alkaloids in V79 cells, either with or without metabolic activation. In relation to the cytotoxicity, Hartmann and Speit (1997) reported that the occurrence of comets with no heads and with nearly all DNA in the tail (class 4) is probable indication of a cytotoxic effect. The alkaline SCG assay is a sensitive procedure to quantify DNA lesions in mammalian cells, which include single and double DNA strand breaks (Fairbairn *et al.* 1995). The occurrence of class 4 cells has been described as the most obvious aspect of apoptotic cells in the SCG, while apoptotic DNA fragmentation is characterized by the generation of DNA double strand breaks (Fairbairn *et al.* 1995; Hartmann & Speit 1997). In agreement with all these observations, the cytotoxic and genotoxic effects of these β -carboline alkaloids have been related to their injurious action on DNA (Sasaki *et al.* 1992; Shimoi *et al.* 1992; Meester 1995; Picada *et al.* 1997) because of the intercalation of DNA (Meester 1995; Taira *et al.* 1997; Balon *et al.* 1999). Intercalating agents such as acridine and quinacrine stains, as well as antineoplastic agents, can induce chromosome aberrations and DNA strand breaks in mammalian cells (De Marini & Laurence 1992; Suzuki *et al.* 1995; Araújo *et al.* 1998; Palitti

1998). Moreover, many intercalating agents are DNA topoisomerase inhibitors and can interfere with the breakage-rejoining action of these enzymes, resulting in the formation of complexes between enzyme and DNA, favoring DNA strand breaks (Chen & Liu 1994; Wang 1996, 1998; Hammonds et al. 2000). Funayama *et al.* (1996) observed that some β -carboline alkaloids, such as harman and norharman, inhibit DNA relaxation by topoisomerases I and II. In addition, Boeira and co-workers (*in prep*) observed that the recombination-deficient mutant *rad 52-1* of yeast *Saccharomyces cerevisiae* - defective in the repair of single and double DNA strand breaks induced by ionizing radiation or by alkylating agents - was the most sensitive to harman and harmine among others strains defective in excision repair (*rad3-e5* and *rad1* Δ) and in mutagenic repair (*rad6* Δ) pathways (for review, see Friedberg *et al.* 1995; Nickoloff & Hoekstra 1998; Prakash & Prakash 2000). All this information indicates that harman and harmine may be able to induce DNA strand breaks, probably due to their ability to cause damage in different systems, such as, as frameshift mutation (Wehner *et al.* 1979; Oda *et al.* 1988; Picada *et al.* 1997; Boeira *et al. in prep.*), SOS response (Oda *et al.* 1988; Picada *et al.* 1997), sister-chromatid exchange (Madle *et al.* 1981; Tohda *et al.* 1983; Table 3).

The values of image length were significant only when MMS was used in combination with highest harman and harmine doses. In contrast, when harman or harmine were used alone, they induced a slight increase of image length compared to the control. Similar results have been described by other authors (Olive *et al.* 1992; Silva *et al.* 2000b) who discussed the usefulness of measuring tail length as a parameter for DNA damage in the Comet assay. This was based on the observation that the distance of migration reached a plateau while the DNA tail:head ratio continued to increase.

The difference observed from the damage index in the presence and in absence of metabolic activation by Comet assay in V79 cells (Table 2) was significant after treatment with harman at the 40 µg/ml dose. The pronounced sensibility of harman in all doses without S9-mix in relation to the same doses with S9-mix, are in agreement with the results for the SOS cromotest in *E. coli*. In that case, this alkaloid showed positive result in the absence of S9-mix and negative in the presence of metabolic activation (Picada *et al.* 1997). In the same study, harman was mutagenic in TA97 (frameshift strain) in the direct test, partially losing its activity in the presence of metabolic activation. Harman is known to be hydroxylated at C-6 by mouse liver microsomes induced by phenobarbital (PB) *in vitro* or by 3-methylchloranthrene (3-MC) and also by uninduced S9-mix (Tweedie *et al.* 1988). Thus, harman may be partly biotransformed to non-genotoxic metabolites by hydroxylation in position C-6 through microsome enzymes in the bacterial test. Likewise, harman probably reduced DNA damage by metabolic activation in the V79 cells. The present results is also compatible with the findings that harman induced sister chromatid exchange (SCE) in human peripheral lymphocytes in the absence of microsomal enzymes (Madle *et al.* 1981). In contrast, the DNA damage induced by harmine did not show any difference in the presence or absence of metabolic activation. Nevertheless, the values of the damage index, when the highest alkaloid doses were added to MMS did not show a clear modulation effect, although harman slightly increased the DNA damage, and harmine slightly decreased the damage in relation to the control.

In the present study a very strong association between the two types of damage was found. Also the sensitivity of the Comet assay was higher than that of the chromosome

aberration test. The small difference between these assays may be due to DNA strand breaks detected by Comet assay and not all of them may result in chromatid or chromosomal fragments.

The results presented herewith concur with those of other authors (see Table 3) and they point out the capability of both harman and harmine to cause genome damage. In general, the induction of genotoxic damage such as chromosomal and DNA lesions is strongly correlated with the mutagenic and carcinogenic activity (Bertram 2001). Therefore, genotoxic damage can be considered a relevant biomarker for carcinogenic risk.

In conclusion, this work provides evidence for the genotoxicity of harman and harmine, and confirms the usefulness of the Comet assay in V79 cells for evaluation of drugs. However, their biological effect still cannot be fully appreciated understood and more studies are need in order to evaluate the safe dose-limit of β -carboline alkaloids consumption.

Acknowledgements: We thank Drs. Martin Brendel, Cristine Gaylarde and Eloy Julius Garcia for helpful reading and discussion. This work was supported by the Brazilian agencies: CNPq and FAPERGS; and GENOTOX - Centro de Biotecnologia, UFRGS. J. M. B. held a CAPES doctoral grant.

References

- Adashi, J., Y. Mizoi, T. Naito, K. Yamamota, S. Fujiwara & I. Ninomiya: Determination of β -carbolines in foodstuffs by high-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatog.* 1991, **538**, 331-339.
- Airaksinen, M. M. & I. Kari: Beta-carbolines, psychoactive compounds in the mammalian body. Part I: Occurrence, origin and metabolism. *Med. Biol.* 1981, **59**, 21-34.
- Allen, J. R. F. & B.R. Holmstedt: The simple β -carboline alkaloids. *Phytochemistry* 1980, **19**, 1573-1582.
- Araújo, M. C. P., F. L. Dias, A. O. Cecchi, L. M. G. Antunes & C. S. Takahashi: Chromosome damage induced by DNA topoisomerase II inhibitors combined with γ -radiation *in vitro*. *Gen. Mol. Biol.* 1998, **21**, 407-413.
- Balon, M, M. A. Munoz, C. Carmona, P. Guardado & M. Galan: A fluorescence study of the molecular interactions of harmine with the nucleobases, their nucleosides and mononucleotides. *Biophys. Chemistry* 1999, **80**, 41-52.
- Bertram, J. S.: The molecular biology of cancer. *Mol. Aspects Med.* 2001, **21**, 167-223.
- Boeira, J. M., A. F. Viana, J. N. Picada & J. A. P. Henriques: Genotoxic and recombinogenic activities of the two β -carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*. *In preparation*.
- Bruneton, J.: Drogas com alkaloids derivados del triptofano. In: *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*. Zaragoza: Acribia AS 1991, 466-470.

- Callaway, J. C., L. P. Raymon, W. L. Hearn, D. J. McKenna, C. S. Grob, G. S. Brito & D. C. Mash: Quantitation of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with *ayahuasca*. *J. Analytical Toxicol.* 1996, **20**, 492-497.
- Casale, J. F. & J. E. Koles: Analysis of ayahuasca ('Santo Daime' [sic]). *Microgram.* 1995, **28**, 296-299.
- Chen, A. Y. & L. F. Liu: DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1994, **34**, 191-218.
- Collins, A., M. Ai-guo & Duthie, S. J: The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res.* 1995, **336**, 69-77.
- Collins, A., M. Dusinská, M. Franklin, M. Somorosvská, H. Petrovská, S. Duthie, L. Fillion, M. Panayiotidis, K. Raslová & N. Vaughan: Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ. Mol. Mutagen.* 1997, **30**, 139-146.
- De Marini, D. M. & B. K. Lawrence: Prophage induction by DNA topoisomerase II poisons and reactive-oxygen species: role and DNA breaks. *Mutat. Res.* 1992, **267**, 1-17.
- Fairbairn, D. W., P. L. Olive & K. L. O'Neill: The Comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 1995, **339**, 37-59.
- Ferguson, L. R. & B. C. Bagully: Topoisomerases II enzymes and mutagenicity. *Environ. Mol. Mutagen.* 1994, **24**, 295-261.
- Friedberg, E. C., G. C. Walaker & W. Siede: *DNA repair and mutagenesis* 1995, ASM Press, Washington, USA.

- Funayama, Y., K. Nishio, K. Wakabayashi, M. Nagao, K. Shimoi, T. Ohira, S. Hasegawa & N. Saijo: Effects of β - and γ -carboline derivatives on DNA topoisomerase activities. *Mutat. Res.* 1996, **349**, 183-191.
- Gross, G. A., L. B. Turesky, L. B. Fay, W. G. Stillwell, P. L. Skipper & S. R. Tannenbaum: Heterocyclic aromatic amine formation in grilled bacon, beef and fish and grill scrapings. *Carcinogenesis* 1993, **14**, 2313-2318.
- Hammonds, T. R., S. R. Foster & A. Maxwell: Increased sensitivity to quinolone antibacterials can be engineered in human topoisomerase II α by selective mutagenesis. *J. Mol. Biol.* 2000, **300**, 481-491.
- Hartmann, A. & G. Speit: The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol. Lett.* 1997, **90**, 183-188.
- Hashimoto, Y., K. Kawanishi & M. Morriyasu: Forensic chemistry of alkaloids. *The alkaloids: Chemistry and Pharmacology* 1988, **32**, 40-45.
- Levitt, R. C., C. Legraverend, D. W. Nebert & ° Pelkonen: Effects of harman and norharman on the mutagenicity and binding to DNA of benzo[a]pyrene metabolites, in vitro and on aryl hydrocarbon hydroxylase induction in cell culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977, **79**, 1167-1175.
- IAEA: Biological Dosimetry: chromosomal aberration analyses for dose assessment. Technical report, *International Atomic Energy Agency*, Vienna, 1986, pp. 260.
- Madle, E., G. Obe, J. Hansen & H. Ristow: Harman and norharmane: induction of sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes in vitro and interaction with isolated DNA. *Mutat. Res.* 1981, **90**, 433-442.

- Meester, C.: Genotoxic potential of β -carbolines: a review. *Mutation Res.* 1995, **339**, 139-153.
- Nagao, M. T. Yahagi & T. Sugimura: Differences in effects of norharman with various classes of chemical mutagens and amounts of S9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1978, **83**, 373-378.
- Nakayasu, M., F. Nakasato, H. Sakamoto, M. Terada & T. Sugimura: Mutagenic activity of norharman and harman in Chinese lung cells in assay with diphtheria toxin resistance as a marker. *Cancer Lett.* 1983, **17**, 249-255.
- Nickoloff, C. E. & M. F. Hoekstra: *DNA damage and repair*, 1998. Human Press, Totowa, New Jersey, USA.
- Oda, Y., S-I. Nakamura & I. Oki: Harman and norharman induce SOS responses and frameshift mutations in bacteria. *Mutat. Res.* 1988, **208**, 39-44.
- Olive, P. L., D. Wlodek, R. E. Durant & J. P. Banáth: Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp. Cell Res.* 1992, **198**, 259-267.
- Palitti, F.: Mechanisms of origin of chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 1998, **404**, 133-137.
- Picada, J. N., K. V. C. L. da Silva, B. Erdtmann, A. T. Henriques & J. A. P. Henriques: Genotoxic effects of structurally related β -carbolines alkaloids. *Mutat. Res.* 1997, **379**, 135-149.
- Prakash, L & S. Prakash: Nucleotide excision repair in yeast. *Mutat. Res.* 2000, **451**, 13-24.

- Sasaki, Y. F. & Y. Shirasu: Suppressing effects of S phase post-treatment with carbolines on sister-chromatid exchanges induced by mitomycin C in Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 1993, **302**, 165-171.
- Sasaki, Y. F., H. Yamada, K. Shimoi, N. Kinae, I. Tomita, H. Matsumura, T. Ohta, & Y. Shirasu: Enhancing effects of heterocyclic amines and β -carbolines on the induction of chromosome aberrations in culture mammalian cells. *Mutat. Res.* 1992, **269**, 79-95.
- Savage, J. R. K.: A comment on the quantitative relationship between micronuclei and chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 1988, **207**, 33-36.
- Silva, J, T. R. O. Freitas, V. Heuser, J. R. Marinho, & B. Erdtmann: Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by Comet assay and Micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.* 2000a, **35**, 270-278.
- Silva, J, T. R. O. Freitas, V. Heuser, J. R. Marinho, G. Speit & B. Erdtmann: An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genet. Mol. Biol.* 2000b, **23**, 241-245.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice & E. L. Scheider: A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988, **175**, 184-191.
- Shimoi, K, H. Kawabata & I. Tomita: Enhancing effect of heterocyclic amine and β -carbolines on UV or chemically induced mutagenesis in *E. coli*. *Mutat. Res.* 1992, **268**, 287-295.
- Somorovska, M., J. Tulinska, M. Barancokova, M. Zamecnikova, A. Collins, A. Liskova, B. Vallova, H. Petrovska, E. Jahnova, P. Vodicka, L. Fuortes & M. Dusinka: The comet assay in biomonitoring of occupational exposure in rubber factory and plastic lamination plant. Comparison with cytogenetic and immune Biomarkers. *Neoplasma* 1999, **46**, 23-25.

- Speit, G., B. Habermeier & R. Helbig: Differences in the response to mutagens between two V79 sublines. *Mutat. Res.*, 1994, **325**, 105-111.
- Suzuki, H., T. Ikeda, T. Yamagishi, S. Nakaike, S. Nakane & M. Ohsawa: Efficient induction of chromosome-type aberrations by topoisomerase II inhibitors closely associated with stabilization of the cleavable complex in cultured fibroblastic cells. *Mutat. Res.* 1995, **328**, 151-161.
- Taira, Z., S. Kanzawas, C. Dohara, S. Ishida, M. Matsumoto & Y. Sakiya: Intercalation of six beta-carboline derivatives into DNA. *Jap. J. Toxicol. & Environ. Health* 1997, **43**, 83-91.
- Totsuka, Y., H. Ushiyama, J. Ishihara, R. Sinha, S. Goto, T. Sugimura & K. Wakabayashi: Quantification of the co-mutagenic beta-carbolines, norharman and harman, in cigarette smoke condensates and cooked foods. *Cancer Lett.* 1999, **143**, 139-143.
- Tohda, H., M. Tada, R. Sugawara & A. Oikawa: Actions of amino- β -carbolines on induction of sister-chromatid exchanges. *Mutat. Res.* 1983, **116**, 137-147.
- Tweedie, D. J., R. A. Prough & M. D. Burke: Effects of induction on the metabolism and cytochrome P-450 binding of harman and other β -carbolines. *Xenobiotica* 1988, **18**, 785-796.
- Wakabayashi, K., T. Yahagi, M. Nagao & Sugimura: Comutagenic effect of norharman with aminopyridine derivatives. *Mutat. Res.* 1982, **105**, 205-210.
- Wang, J. C.: DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 1996, **65**, 635-692.
- Wang, J. C.: Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Quart. Rev. Biophys.* 1998, **31**, 107-144.

Wehner, F. C., P. G. Thiel & S. J. Van Rensburg: Mutagenicity of alkaloids in the Salmonella/microsome system. *Mutat. Res.* 1979, 66, 187-190.

Zheng, W., S. Wang, L. F. Barnes, Y. Guan & E. D. Louis: Determination of harmaline and harmine in human blood using reversed-phased high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Anal. Biochem.* 2000, 279, 125-129.

IV - DISCUSSÃO

Os alcalóides β -carbolínicos harmano e harmina presentes em uma variedade de famílias de plantas estão também presentes em nossos alimentos, bebidas alcoólicas, na fumaça do cigarro, e também em vários tecidos e líquidos biológicos de animais, inclusive no homem (Allen e Holmstedt 1980; Meester 1995; Henriques *et al.* 1999; Zheng *et al.* 2000).

Nos vegetais, estes alcalóides se originam do aminoácido triptofano, a partir de reações de Mannich (Husson 1985), enquanto que nos mamíferos existem evidências que se formem endogenamente pela reação de Picquet-Spengler (Ducrot *et al.* 2000). Nos mamíferos, também podem ser formados após a ingestão de bebidas alcoólicas como um produto da condensação entre o acetaldeído com aminas endógenas (Rommelspacher *et al.* 1984, 1996), sendo desta forma responsáveis por alguns efeitos farmacológicos e a dependência ao álcool (Murray & Berger 1997).

Estes alcalóides são conhecidos por apresentarem várias ações farmacológicas sobre os sistemas nervoso central, muscular e cardiovascular, causando alucinações, tremores, convulsões, hipotensão e bradicardia (Ergene e Schoener 1993; Meert 1994). Alguns estudos indicam também atividades antioxidante e imunossupressora para estes compostos (Tse *et al.* 1991; Peres 1999), além de se ligarem à receptores de serotonina, dopamina e benzodiazepina (Pimpinella e Palmery 1995; Grella *et al.* 1998; Glennon *et al.* 2000); são também inibidores das enzimas monoamino-oxidase-A (MAO-A) e DNA topoisomerases (Funayama *et al.* 1996; Kim *et al.* 1997).

Harmano e harmina são, portanto, alcalóides de interesse na medicina e na pesquisa devido à várias respostas que eles provocam em vários sistemas biológicos.

Muitas destas atividades são atribuídas à capacidade destes alcalóides em se intercalarem no DNA (Meester 1995; Taira *et al.* 1997; Balon *et al.* 1999).

No presente estudo, foi investigada a genotoxicidade destes dois alcalóides, harmano e harmina, em dois sistemas eucariotos, na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e em culturas de células de pulmão de hamster Chinês, células V79.

4.1 Citotoxicidade na levedura e em culturas de células de mamíferos

Os efeitos citotóxicos dos alcalóides harmano e harmina na levedura *S. cerevisiae* e em culturas de células de pulmão de hamster Chinês (células V79) dependem da fase de crescimento das linhagens – no caso da levedura - e das concentrações dos alcalóides (capítulos I e II). Em ambos os sistemas, harmina causou um efeito mais pronunciado que harmano. Resultados semelhantes também foram observados em células CHO-K1 (células de ovário de hamster Chinês; Sasaki *et al.* 1992) e em culturas de *Salmonella typhimurium* (Picada *et al.* 1997) tratadas com estes compostos em doses semelhantes. Na levedura, harmano e harmina não induziram toxicidade em culturas haplóides (Capítulo I) e diplóides (resultados não mostrados) em fase estacionária. Resultados contrários foram observados com harmano e harmina em fase exponencial, nos quais células haplóides e diplóides tratadas com estes alcalóides, em meio rico ou com PBS, demonstraram um pronunciado efeito citotóxico. Picada *et al.* (1997) também observaram resultados similares em culturas de *Salmonella typhimurium*. Supõem-se, desta forma, que a citotoxicidade destes compostos esteja relacionada com a habilidade dos mesmos em se intercalarem no DNA (Taira *et al.* 1997; Balon *et al.* 1999).

Harmano e harmina possuem uma estrutura aromática tricíclica, porém harmina difere de harmano apenas pela presença de uma metoxila ligada ao C₇ (Figura 1, Capítulos I e II). Acredita-se que a estrutura aromática destes compostos possibilita a sua intercalação no DNA (Duportail 1981; Taira *et al.* 1997; Balón *et al.* 1999) e que o grupo metoxila presente na estrutura da harmina favoreça esta intercalação (Taira *et al.* 1997). Tal característica pode explicar a citotoxicidade aumentada da harmina, em relação ao harmano, nas culturas da levedura em fase exponencial. Harmina também apresentou toxicidade mais elevada que harmano em duas diferentes linhagens epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Rivas *et al.* 1999) e, ao contrário do harmano, apresentou citotoxicidade *in vitro* contra várias linhagens de células tumorais (Ishida *et al.* 1999), novamente sugerindo a importância do grupo metoxila sobre a ação deste alcalóide.

4.2 Mutagênese e Recombinogênese em *S. cerevisiae*

Harmano e harmina não induziram mutações quando as células foram tratadas em condições de crescimento (Capítulo I). Porém, quando as células foram tratadas em fase exponencial com salina, ambos os alcalóides induziram mutações nos locus *his1-7* (mutação *missense*), *lys1-1* (mutação *forward*) e *hom3-10* (mutação *frameshift*). As frequências das mutações observadas nos locus de *his1* foram significativas apenas nas doses mais elevadas dos dois alcalóides, enquanto que para os loci de *lys1-1* e *hom3-10*, foram significativas em quase todas as doses testadas. No entanto, apenas mutações causadas por supressores, evidenciadas pela presença de colônias brancas, foram observadas para o locus de *lys1-1* (*forward*). Portanto, pode-se considerar que harmano e harmina apresentam uma atividade mutagênica fraca. Picada *et al.* (1997), também

demonstraram que harmano e harmina induziram mutação *frameshift* em linhagens TA97 e TA98 de *Salmonella typhimurium*. Outros autores observaram que agentes intercalantes com estrutura aromática e tricíclica, tais como as acridinas (Figura 7), induzem mutações *frameshift* em *S. typhimurium* (McCoy *et al.* 1981). Assim como as acridinas, harmano e harmina apresentam uma estrutura tricíclica, portanto, pode-se sugerir que esta característica seja responsável pelo mesmo tipo de mutação observada.

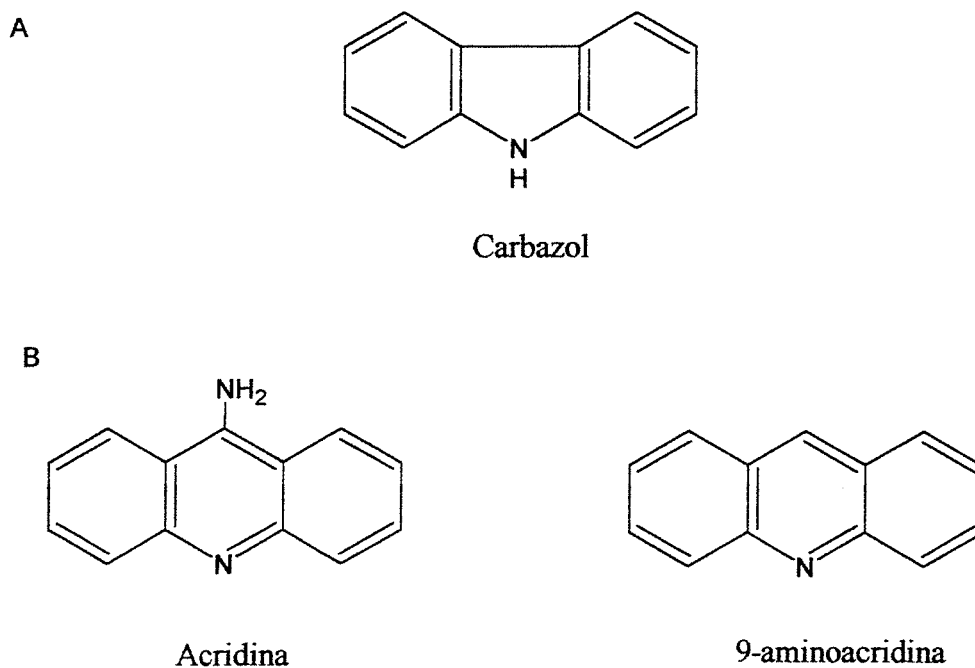


Figura 7 - Compostos com estrutura tricíclica: A) Carbazol; B) Acridinas

Ambos os alcalóides harmano e harmina induziram recombinação apenas em condições de crescimento (Capítulo I), embora somente harmina tenha induzido permuta (*crossing-over*) e conversão gênica estatisticamente significativas. Estes resultados novamente explicam o fato da harmina ser um intercalante mais eficiente que harmano (Taira *et al.* 1997). Portanto, a recombinação mitótica observada em

células durante o crescimento na presença de harmina podem ser resultantes de quebras de cadeias simples e duplas no DNA provocadas pela intercalação deste alcalóide. Além disso, Funayama *et al.* (1996) demonstraram que alguns alcalóides β -carbolínicos inibem as enzimas DNA topoisomerasas I e II. Da mesma forma, agentes intercalantes que causam mutações *frameshift* estão também relacionados com quebras no DNA induzidas pelas enzimas DNA topoisomerasas (Pasqual *et al.* 1993).

4.3 Efeitos de harmano e harmina sobre linhagens de *S. cerevisiae* deficientes em sistemas de reparo

Linhagens da levedura *S. cerevisiae* deficientes em determinadas vias de reparo são bastante utilizadas para se verificar a natureza das lesões induzidas por diferentes agentes naturais ou químicos sobre o DNA. Se um mutante deficiente em uma determinada via de reparo apresenta uma sensibilidade maior que a linhagem selvagem, proficiente na reparação, pode-se inferir que o agente estudado induz o tipo de lesão incapaz de ser reparada pelo mutante. Assim, a sensibilidade do mutante *rad52-1*, deficiente na via recombinogênica, tratados com harmano e harmina, sugerem um bloqueio no reparo das lesões produzidas por estes alcalóides (Capítulo I). Uma vez que o mutante *rad52-1* não pode reparar quebras simples e duplas no DNA induzidas por radiações ionizantes ou agentes alquilantes (para revisão ver, Friedberg *et al.* 1995; Nickoloff & Hoekstra 1998), acredita-se que ambos os alcalóides, direta ou indiretamente, produzam o mesmo tipo de lesão. Resultados semelhantes também foram observados por drogas intercalantes antitumorais como BD-40, um derivado pirido-pirrol-isoquinolínico (Moustacchi *et al.* 1983) e berberina (Pasqual *et al.* 1993).

O mutante *rad6Δ*, deficiente na via mutagênica, mostrou uma pronunciada sensibilidade aos dois alcalóides (Capítulo I). A via *RAD6* também está envolvida no reparo de quebras simples e duplas do DNA induzidas por agentes alquilantes mono e bi-funcionais (para revisão ver, Brendel *et al.* 1970; Friedberg *et al.* 1995; Nickloff & Hoekstra 1998). Nossos resultados, portanto, leva-nos a acreditar mais uma vez que ambos os alcalóides, provavelmente, são capazes de produzir quebras simples e/ou duplas no DNA. Entretanto, a sensibilidade apresentada pelos mutantes defectivos na reparação por excisão-ressíntese (*rad3-e5*, *rad1Δ*) a esses alcalóides permite inferir que, como previamente descrito por Yamashita *et al.* (1988) e Wakabayashi (1997), harmano e harmina também induzem adutos no DNA.

As análises das interações entre os diferentes mutantes *rad* (Capítulo I) em relação aos danos no DNA induzidos por harmano e harmina mostraram uma interação epistática entre os alelos mutantes *rad3-e5* e *rad52-1*, enquanto que entre os mutantes *rad1Δ* e *rad6Δ* foi observada uma interação não-epistática. Esta interação não-epistática indica que ambas as vias de excisão-ressíntese e sujeita à erro (via mutagênica) podem, independentemente, estarem envolvidas no reparo das lesões causadas por estes alcalóides. Desta forma, cada via de reparo compete para o mesmo tipo de lesão (sinergismo) ou pode preferencialmente, processar um tipo de lesão no DNA (aditividade). Por outro lado, a interação epistática observada entre os alelos mutantes *rad3-e5* e *rad52-1* implica que alguns passos do reparo por excisão-ressíntese (via *RAD3*) e do reparo por recombinação (via *RAD52*), podem colaborar no reparo das lesões induzidas por harmano e harmina.

4.4 Aberrações cromossômicas

O teste de aberrações cromossômicas (CA) é um teste que detecta danos citogenéticos induzidos por diferentes agentes. As aberrações cromossômicas resultam de vários mecanismos, tais como, quebras diretas sobre o DNA, replicação de um molde de DNA danificado, inibição da síntese do DNA, inibidores de DNA topoisomerasas, entre outros. Harmano e harmina, usados em diferentes doses, aumentaram as aberrações cromossômicas (Capítulo II) na ausência de um sistema de ativação metabólica, embora eles não tenham mostrado um claro efeito dose-resposta. Assim, apesar destes compostos induzirem danos nos cromossomos das células de mamíferos, eles devem ser considerados agentes clastogênicos fracos. Dados na literatura sobre o efeito genotóxico destes compostos são controversos e estão sumarizados na tabela 3 (Capítulo II). Nossos dados em relação às aberrações cromossômicas nas células V79 estão de acordo com os descritos por Thoda *et al.* (1983), que utilizou células linfoblastóides humanas (NL3) na ausência de ativação metabólica, nos quais estes compostos induziram trocas de cromátides irmãs. Picada *et al.* (1997) também observaram um aumento, porém não significativo, de danos cromossomais através do teste de micronúcleos em camundongos. Em contraste, Sasaki *et al.* (1992) demonstraram que harmano e harmina não induziram aberrações em células CHO-K1. Neste mesmo estudo, harmano e harmina foram usados em doses maiores do que as utilizadas no nosso trabalho. Tais diferenças poderiam ser indicativas de que a linhagem V79, células de pulmão de hamster Chinês, foram mais sensíveis para a determinação de CA induzidas por estes alcalóides do que a linhagem CHO-K1, células de ovário de hamster Chinês. Isto indica que há diferenças na sensibilidade de cada teste e, também, em relação à complexidade de cada linhagem e organismo usado. Speit *et al.* (1994)

também encontraram diferenças em testes de genotoxicidade usando duas sub-linhagens de V79. Estes resultados controversos indicam que podem ocorrer diferenças de respostas entre algumas linhagens, as quais significativamente influenciam os testes de genotoxicidade (Speit *et al.* 1994).

4.5 Ensaio Cometa

O ensaio Cometa alcalino (SCG) pode ser aplicado a qualquer tipo celular e organismo eucarioto, além de ser rápido, levando poucas horas para se obter os resultados (Singh e Stephens 1996). Este ensaio é um procedimento sensível para analisar lesões e detectar efeitos de reparo no DNA em células individuais expostas à agentes genotóxicos (Singh *et al.* 1988; Fairbairn *et al.* 1995; Singh 2000). Dentre estes danos incluem-se as quebras simples e duplas no DNA, complementando estudos preliminares com agentes que causam estes danos.

Harmano e harmina aumentaram significativamente os índices e as frequências de danos no DNA detectados pelo ensaio Cometa em fibroblastos de pulmão de hamster Chinês (células V79), com e sem ativação metabólica (Capítulo II). Além disso, a ocorrência de cometas classe 4 (com quase todo DNA na cauda) é uma provável indicação de um efeito citotóxico e geração de quebras duplas no DNA (Fairbairn *et al.* 1995; Hartmann e Speit 1997). Os efeitos citotóxicos e genotóxicos destes alcalóides têm sido relacionados com os danos que eles provocam sobre o DNA (Sasaki *et al.* 1992; Shimoi *et al.* 1992; Meester 1995; Picada *et al.* 1997) devido à sua intercalação no DNA (Meester 1995; Taira *et al.* 1997; Balón *et al.* 1999). Agentes intercalantes tais como as acridinas e outros corantes, assim como agentes antineoplásicos, também podem induzir aberrações cromossômicas e quebras no DNA em células de mamíferos

(De Marini & Laurence 1992; Suzuki *et al.* 1995; Araújo *et al.* 1998; Palitti 1998). Além disso, muitos agentes intercalantes são inibidores das enzimas DNA topoisomerasas e podem interferir na ação de quebra-religação destas enzimas, resultando na formação de complexos entre a enzima e o DNA, favorecendo as quebras no DNA (Chen e Liu 1994; Wang 1996, 1998; Hammonds *et al.* 2000). Todas estas informações indicam que harmano e harmina podem ser capazes de provocar quebras no DNA, provavelmente devido à sua habilidade de causar danos no DNA em diferentes sistemas, tais como, mutações que detectam alterações no quadro de leitura (*frameshift*) (Wehner *et al.* 1979; Oda *et al.* 1988; Picada *et al.* 1997; Capítulo I), resposta SOS (Oda *et al.* 1988; Picada *et al.* 1997), troca de cromátides-irmãs (Madle *et al.* 1981; Tohda *et al.* 1983), conforme revisado na Tabela 3 (Capítulo II).

Os resultados também obtidos pelo ensaio Cometa permitiram detectar diferenças significativas no comprimento de imagem dos cometas apenas quando MMS foi usado em combinação com as doses mais elevadas de harmano e harmina (Capítulo II). Em contraste, quando estes alcalóides foram usados sozinhos, eles induziram um leve aumento no comprimento de imagem não significativo quando comparado ao controle. Resultados semelhantes foram descritos por outros autores (Olive *et al.* 1992; Silva *et al.* 2000b) que discutiram a utilidade da medida do comprimento da cauda como um parâmetro de análise em testes neutros ou alcalinos para os danos no ensaio Cometa. Isto se baseia na observação que embora o tamanho do cometa atinja um platô, a relação cauda/cabeça continua aumentando. Esta relação é considerada quando se faz a classificação dos cometas observados, levando a obtenção do índice de danos.

A diferença observada em relação ao índice de dano em presença e ausência de ativação metabólica através do ensaio Cometa foi significativo após o tratamento com

harmano na dose de 40 µg/ml ($P < 0.05$). A sensibilidade pronunciada de harmano em todas as doses sem S9-mix, em relação às mesmas doses com S9-mix, estão de acordo com os resultados do Cromoteste SOS em *E. coli* (Picada *et al.* 1997). Neste mesmo estudo, harmano causou mutação por defasagem do quadro de leitura na linhagem TA97 de *Salmonella* no teste direto, perdendo parcialmente sua atividade na presença de ativação metabólica. Isto indica que harmano pode ter sido parcialmente biotransformado, no teste bacteriano, em metabólitos não genotóxicos pela hidroxilação na posição do Carbono 6 através de enzimas microssomais, pois este alcalóide é conhecido por ser hidroxilado nesta posição (Tweedie *et al.* 1988). Da mesma forma, harmano provavelmente reduziu os danos no DNA, detectados no ensaio Cometa, em presença de ativação metabólica nas células V79. Estes resultados também estão de acordo com os de Madle *et al.* (1981), que observaram que harmano induziu SCE em linfócitos periféricos humanos na ausência de ativação metabólica. Em contraste, os danos induzidos por harmina não mostraram diferença em presença e ausência de ativação metabólica. Entretanto, a análise dos índices de danos no DNA provocados por estes alcalóides quando em doses elevadas foram adicionadas ao MMS, não mostraram um claro efeito modulatório, embora harmano levemente tenha aumentado os danos, e harmina tenha diminuído-os em relação ao controle.

No presente estudo, encontrou-se uma forte associação entre os dois tipos de danos detectados pelo ensaio Cometa e pelo teste de aberrações cromossômicas, embora a sensibilidade do ensaio Cometa tenha sido maior que no teste de aberrações cromossômicas. Esta diferença pode ser devido às quebras no DNA detectadas pelo ensaio Cometa que nem sempre resultam em fragmentos cromatídicos ou cromossomais, os quais são detectados pelo teste de aberrações.

Os resultados encontrados neste estudo indicam a capacidade de harmano e harmina em causar danos no genoma. Em geral, a indução de danos genotóxicos tais como cromossomais e lesões no DNA é fortemente correlacionada com a atividade mutagênica e carcinogênica (Bertram 2001). Portanto, danos genotóxicos podem ser considerados biomarcadores relevantes para riscos carcinogênicos.

Em conclusão, os resultados encontrados fornecem evidências da genotoxicidade de harmano e harmina em leveduras e em células V79. No entanto, os efeitos biológicos destes compostos ainda não são completamente entendidos e mais estudos são necessários para avaliar a dose-limite segura destes alcalóides β -carbolínicos, uma vez que eles apresentam uma série de atividades farmacológicas, são utilizados como antioxidantes e ainda podem estar presentes na nossa alimentação.

V - CONCLUSÕES

1. Conclusão Geral

Os resultados apresentados neste estudo revelam que os alcalóides β -carbolínicos harmano e harmina nos dois sistemas eucariotos, levedura *Saccharomyces cerevisiae* e em culturas de células de pulmão de hamster Chinês (V79), foram citotóxicos, mutagênicos e clastogênicos.

2. Conclusões Específicas

- Os alcalóides harmano e harmina apresentam uma importante citotoxicidade para a levedura *S. cerevisiae* e para culturas de fibroblastos de pulmão de hamster Chinês (células V79), nas concentrações utilizadas. Este efeito citotóxico é mais pronunciado para harmina;
- Na levedura *S. cerevisiae*, o efeito citotóxico desses alcalóides ocorre unicamente em células haplóides e diplóides em fase exponencial de crescimento;
- Harmano e harmina mostraram resposta mutagênica em células haplóides de levedura em fase exponencial na ausência de crescimento (salina) para os locus *his1-7* (mutação *missense*), *lys1-1* (mutação *forward*) e *hom3-10* (mutação *frameshift*);
- Apenas o alcalóide harmina induziu recombinação (*crossingover* e conversão gênica) em células diplóides tratadas em condições de crescimento;

- A pronunciada sensibilidade dos mutantes *rad6Δ* (defectivo na via mutagênica) e *rad52-1* (deficiente em recombinação) ao harmano e harmina, permite inferir que estes alcalóides induzem, direta ou indiretamente, quebras simples e duplas nas cadeias de DNA;
- A sensibilidade dos mutantes defectivos nas vias de reparação por excisão-ressíntese (*rad3-e5*, *rad1Δ*) a ambos os alcalóides sugere que os mesmos induzem provavelmente a produção de adutos no DNA;
- A interação epistática observada entre os mutantes *rad3-e5* e *rad52-1* indica que as lesões provocadas por esses alcalóides necessitam, para serem reparadas, da ação conjunta dos mecanismos de reparação por excisão-ressíntese e por recombinação;
- O pequeno aumento de aberrações cromossômicas induzidas por harmano e harmina, em culturas de fibroblastos de pulmão de hamster Chinês, mostra que estes compostos são clastogênicos fracos;
- Os índices e as frequências de danos sobre o DNA, detectados pelo ensaio Cometa em células V79, em presença e ausência de ativação metabólica também indicam que harmano e harmina induzem quebras de cadeias simples e duplas no DNA.

VI - PERSPECTIVAS

Seria de extrema relevância complementar os trabalhos apresentados com harmano e harmina (Capítulos I e II), fazendo os mesmo testes genotóxicos com os outros alcalóides pertencentes ao sistema β -carbolina (forma aromática), como norharmano e harmol, e também com alcalóides do sistema dihidro- β -carbolina (forma parcialmente insaturada), harmalol e harmalina, e do sistema tetrahydro- β -carbolina (forma totalmente saturada), principalmente o 1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolina, uma vez que estes compostos apresentam estruturas similares, porém diferem nos grupos substituintes e também no grau de aromaticidade dos anéis que os compõem. Desta forma, poderia se estabelecer a relação entre a atividade genotóxica e estrutura dos alcalóides deste grupo.

Além disso, devido à possível ação dos alcalóides harmano e harmina sobre o sistema dopaminérgico (Pimpinella e Palmery 1995; Glennon *et al.* 2000), em animais e humanos, seria extremamente interessante analisar a ação destes alcalóides sobre a função nervosa, através da caracterização dos efeitos comportamentais da administração sistêmica e intra-cerebral em ratos. Desta forma, se poderia compreender melhor os mecanismos envolvidos em determinadas patologias neurológicas, como a Doença de Parkinson, assim como os possíveis efeitos destas substâncias sobre a memória.

De igual importância seria analisar os efeitos do harmano e harmina sobre o stresse oxidativo, na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando linhagens mutantes deficientes em determinados genes, como superóxido dismutase (SOD), glutaciona

(GSH), catalase (CAT) e outros, para se compreender melhor a atividade antioxidante destes alcalóides (Tse *et al.* 1991).

No capítulo I, a análise da sensibilidade de simples e duplos mutantes defectivos nas três principais vias de reparação da levedura *S. cerevisiae* aos alcalóides harmano e harmina, permitiu inferir que os mesmos induzem quebras de cadeia simples e/ou duplas no DNA. Como estas quebras são decorrentes provavelmente da capacidade destes alcalóides se intercalarem ao DNA, seria interessante estudar a resposta genotóxica do harmano e harmina frente a linhagens de levedura deficientes em Topoisomerasas I, II e III. Também se poderia determinar a sensibilidade de linhagens contendo duplas mutações *top* (*top1*, *top2*, *top3*) e *rad52*, sendo esta defectiva na reparação por recombinação de quebras de cadeias simples e duplas de DNA.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarons, D. H.; Rossi, G. V.; Orzechowski, R. F. (1977) Cardiovascular actions of three harmala alkaloids: harmine, harmaline, and harmalol. *J. Pharmac. Sci.* 66, 1244-1248
- Abraham, H. D.; Manem, A. (1996) LSD-like panic risperidone in post-LSD visual disorder. *J. Clin. Psychopharmacol.* 16, 238-241
- Albertini, R. J.; Anderson, D.; Douglas, G. R.; Hagmar, K. H.; Merlo, F.; Natarajan, A. T.; Hannu, N.; Shuker, D. E. G.; Tice, R.; Waters, M. D.; Aitio, A. (2000) IPCS guidelines for monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat. Res.* 463, 111-173
- Allen, J. R. F.; Holmstedt, B. R. (1980). The simple β -carbolines alkaloids. *Phytochemistry*, 19, 1573-1582
- Anderson, R. D.; Berger, N. A. (1994). Mutagenicity and carcinogenicity of topoisomerase-interactive agents. *Mutat. Res.* 309, 109-142
- Araújo, M. C. P.; Dias, F. L.; Cecchi, A. O.; Antunes, L. M. G.; Takahashi, C. S. (1998) Chromosome damage induced by DNA topoisomerase II inhibitors combined with γ -radiation *in vitro*. *Gen. Mol. Biol.* 21, 407-413

- Atkin, A. L.; Riazi, M. A.; Greer, C. L.; Roy, K. L.; Bell, J. B. (1993) The functional analysis of nonsense suppressors derived from in vitro engineered *Saccharomyces cerevisiae* tRNA (Trp) genes. *Genes* 134, 57-65
- Balón, M.; Muñoz, M. A.; Carmona, C.; Guardado, P.; Gálan, M. (1999) A fluorescence study of the molecular interactions of harmine with the nucleobases, their nucleosides and mononucleotides. *Biophys. Chemistry* 80, 41-52.
- Barker, S. A.; Harrison, R. E.; Monti, J. A.; Brown, G. B.; Christian, S. T. (1981) Identification and quantification of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline, and 6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline as in vivo constituents of rat brain and adrenal gland. *Biochem. Pharmacol.* 30
- Benfato, M. S.; Brendel, M.; Henriques, J. A. P (1992) The DNA repair gene *PSO3* of *Saccharomyces cerevisiae* belongs to the RAD3 epistasis group. *Curr Genet* 21, 85-90
- Bertram, J. S. (2001) The molecular biology of cancer. *Mol. Aspects Med.* 21, 167-223
- Boisset, M.; Billaud, C.; Desjeux, J.-F. (1994) Studies on the mechanism of intestinal passage of the food comutagen harman, in the rabbit. *Fd. Chem. Toxicol.* 32, 349-356
- Bradley, M. O.; Bhuyan, B.; Francis, M. C.; Langenbach, R.; Peterson, A.; Huberman,

- E.(1981) Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: A review and analysis of the literature. *Mutat. Res.* 87, 81-142
- Brendel, M.; Khan, N. A.; Haynes, R. H. (1970) Common steps in the repair of alkylation and radiation damage in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 106, 289-295
- Brendel, M.; Haynes, R. H. (1973) Interactions among genes controlling sensitivity to radiation and alkylation in yeast. *Molec. Gen. Genet.* 125, 197-216
- Bruneton, J. 1991. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Acribia S.A., Zaragoza, 595 pp.
- Burrows, H. D.; Miguel, M. G. M.; Varela, A. P.; Becker, R. S. (1996). The aqueous solubility and thermal behaviour of some β -carboline. *Thermoch. Acta* 279, 77-82
- Callaway, J. C., Raymon L. P.; Hearn, W. L.; McKenna, D. J., Grob, C. S.; Brito, G. S.; Mash, D. C. (1996) Quantitation of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with *ayahuasca*. *J. Analytical Toxicol.* 20, 492-497
- Callaway, J. C.; McKenna, D. J.; Grob, C. S.; Brito, G. S.; Raymon, L. P.; Poland, R. E.; Andrade, E. N.; Andrade, E. O.; Mash, D. C. (1999) Pharmacokinetics of *Hoasca* alkaloids in healthy humans. *J. Ethopharmacol.* 65, 243-256

- Carrano, A. V.; Natarajan, A. T. (1988) Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques, ICPEMC: International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, 14. *Mutat.Res.* 204, 379-406
- Chen, A. Y.; Liu, L. F. (1994) DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34, 191-218
- Collins, M. A. (1983) Mammalian alkaloids, In: A. Brossi (Eds.), *The alkaloids*, Academic Press, New York, pp. 329-358
- Collins, A. R.; Duthie, S. J.; Dobson, V. L. (1993) Direct enzymatic detection of endogenous base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14, 1733-1735
- Collins, A. R.; Dusinska, M.; Gedik, C. M.; Stetina, R. (1996) Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ. Health Perspect.* 104, 465-469
- Collins, A.; Dusinská, M.; Franklin, M.; Somorosvská, M.; Petrovská, H.; Duthie, S.; Fillion, L.; Panayiotidis, M.; Raslová K.; Vaughan N. (1997) Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ. Mol. Mutagen.* 30, 139-146
- Costa, A. F. (1993) *Farmacognosia Vol. II*, 2 ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa
- Cordell, G. A., Quinn-Beattie, M. L.; Farnsworth, N. R. (2001) The potential of

- alkaloids in drug discovery. *Phytother. Res.* 15, 183-205
- Culmsee, K.; Hirschfeld, D.; Schoenrock, D.; Kreipe, H. H.; Von Bomhard, D.; Schwarz, H.; Nolte, I. (2001) Synovial cell sarcoma in a dog – a case report. *Tierärztliche Praxis Augaba Kleintiere Heimtiere* 29, 88-91
- De Marini, D. M.; Lawrence, B. K. (1992) Prophage induction by DNA topoisomerase II poisons and reactive-oxygen species: role and DNA breaks. *Mutat. Res.* 267, 1-17
- Deveau, A. M.; Labroli, M. A.; Diekhaus, C. M.; Barthen, M. T.; Smith, K. S.; Macdonald, T. L. (2001) The synthesis of amino-acid functionalized beta-carbolines as topoisomerase II inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 1251-1255
- Dine, G.; Bressieux, J. M.; Penouil, M. H.; Brahimi, S. (1995) Kaposi-sarcoma in AIDS patients – treatment with vinblastin-vincristin and molgramostim. *Presse Medic.* 24, 1048-1048
- Ducrot, P.; Rabhi, C.; Thal, C. (2000) Synthesis of tetrahydro- β -carbolines and studies of the Pictet-Spengler reaction. *Tetrahedron* 56, 2683-2692
- Duportail G. (1981) Linear and circular dichroism of harmine and harmaline interacting with DNA. *Int. J. Biol. Macromol.* 3, 188-193
- Ergene, E.; Schoener, E. P. (1993) Effects of harmane (1-methyl- β -carboline) on

- neurons in the nucleus accumbens of the rat. *Pharmacol. Biochem. Behavior* 44, 951-957
- Fairbairn, D. W.; Olive P. L.; O'Neill, K. L (1995) The Comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339, 37-59.
- Felton, J. Z.; Knize, M. G. (1990) Heterocyclic-amine mutagens/carcinogens in foods. In: C. Cooper, P. Grover (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, pp. 471-501
- Ferguson, L. R.; Baguley, B. C. (1996) Mutagenicity of anticancer drugs that inhibit topoisomerase enzymes. *Mutat. Res.* 355, 91-101
- Freedland, C. S.; Mansbach, R. S. (1999) Behavioral profile of constituents in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant mixture. *Drug Alcohol Depend.* 54, 183-194
- Friedberg, E. C.; Walker, G. C.; Siede, W. (1995) *DNA repair and mutagenesis*, ASM Press, Washington, U. S. A
- Fuentes, J. A.; Longo, V. G. (1971) An investigation on the central effects of harmine, harmaline and related β -carbolines. *Neuropharmacology* 10, 15-23
- Funayama, Y.; Nishio, K.; Wakabayashi, K.; Nagao, M.; Shimoi, K.; Ohira, T.;

- Hasegawa, S.; Saijo, N. (1996) Effects of β - and γ -carboline derivatives on DNA topoisomerase activities. *Mutat. Res.* 349, 183-191
- Galloway, S. M. (2000) Cytotoxicity and chromosome aberrations in vitro: experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 191-201
- Game, J. C. (1993) DNA double-strand breaks and the RAD50-RAD57 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Semin. Cancer Biol.* 4, 73-83
- Game, J. C. (2000) The *Saccharomyces* repair genes at the end of the century. *Mutat. Res.* 451, 277-293
- Gangloff, S.; Massy, B.; Arthur, L.; Rothstein, R.; Fabre, F. (1999) The essential role of yeast topoisomerase III in meiosis depends on recombination. *EMBO J.* 18, 1701-1711
- Glennon, R. A.; Dukat, M.; Grella, B.; Hong, S.-S.; Costantino, L.; Teitler, M.; Smith, C.; Egan, C.; Davis, K.; Mattson, M. V. (2000) Binding of β -carboline and related agents at serotonin (5-HT₂ and 5-HT_{1A}), dopamine (D₂) and benzodiazepines receptors. *Drug Alcohol Depend.* 60, 121-132
- Grella, B.; Dukat, M.; Young, R.; Teitler, M.; Herrick-Davis, K.; Gauthier, C.; Glennon, R. A. (1998) Investigation of hallucinogenic and related β -carboline. *Drug Alcohol*

Depend. 50, 99-107

Gross, G. A.; Turesky, L. B.; Fay, L. B.; Stillwell, W. G.; Skipper, P. L.; Tannenbaum, S. R. (1993) Heterocyclic aromatic amine formation in grilled bacon, beef and fish and grill scrapings. *Carcinogenesis* 14, 2313-2318

Hammonds, T. R.; Foster, S. R.; Maxwell, A. (2000) Increased sensitivity to quinolone antibacterials can be engineered in human topoisomerase II α by selective mutagenesis. *J. Mol. Biol.* 300, 481-491

Hardiman, J.; Carrell, H. L.; Zacharias, D. E.; Glusker, J. P. (1987) The structure of harman, a comutagen. *Biorganic Chemistry*, 15, 213-223

Hartmann, A.; Speit, G. (1997) The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol. Lett.* 90, 183-188

Hartmann, A.; Plappert, U.; Raddartz, K.; Grünert-Fuchs, M.; Speit, G. (1994) Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis* 9, 269-272

Hartmann, A.; Herkommer, K.; Glück, M.; Speit, G. (1995a) The DNA damaging effect of cyclophosphamide on human blood cells in vivo and in vitro studied with the single cell gel test (comet assay). *Environ. Mol. Mutagen.* 25, 180-187

Hartmann, A.; Niess, A. M.; Grünert-Fuchs, M.; Poch, B.; Speit, G. (1995b) Vitamin E

- prevents exercise-induced DNA damage. *Mutat. Res.* 346, 195-202
- Hashimoto, Y.; Kawanishi, K.; Morriyasu, M. (1988) Forensic chemistry of alkaloids. *The alkaloids: Chemistry and Pharmacology* 32, 40-45
- Hashimoto, Y.; Yamada, Y. (1994) Alkaloids biogenesis: molecular aspects. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 257-285
- Hawthorne, D. C.; Leupold, U. (1974) Current topics in microbiology and immunology. Springer Verlag, Berlin
- Henriques, J. A. P.; Valsa, J. O.; Gomes, R. A. (1987) Utilização de testes com microorganismos para detecção de atividades mutagênicas e/ou potencialmente oncogênicas, In: Pinto, S. O. C. (Ed.), *Genética Molecular de Microorganismos*, Manole, São Paulo.
- Henriques, J. A. P.; Brozmanova, J.; Brendel, M. (1997) Role of *PSO* genes in the repair of photoinduced interstrand cross-links and photooxidative damage in the DNA of the *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Photochem. Photobiol, B: Biology* 39, 185-196
- Henriques, A. T.; Kerber V. A.; Moreno P. R. H. (1999) Alcalóides: generalidades e aspectos básicos, In: Simões, C. M. O. *et al* (Eds.), *Farmacognosia, da planta ao medicamento*, Ed. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp 641-656

- Herderich, M.; Gutsche, B. (1997) Tryptophan-derived bioactive compounds in food. *Food Rev. Int.* 13, 103-135
- Husson, H. P. (1985). The simple indole alkaloids. In: Brossi, A. (Ed.), *The alkaloid: Chemistry and Pharmacology*, Orlando: Academic Press, Inc. 26, 35-50
- Ishida, J.; Wang, H-K.; Bastow, K. F.; Hu, C-Q.; Lee, K-H. (1999) Antitumor agents 201. Cytotoxicity of harmine and related β -carboline analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 3319-33-24
- Iwasa, K.; Moriyasu, M.; Nader, B. (2000) Fungicidal and herbicidal activities of berberine related alkaloids. *Biosc. Biotech. Biochem.* 64, 1998-2000
- Kanaar, R.; Hoeijmakers, J. H. J.; Van Gent, D. C. (1998) Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. *Trends Cell Biol.* 8, 483-489
- Kim, H.; Sablin, S. O.; Ramsay, R. R. (1997) Inhibition of monoamine oxidase by β -carboline derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* 337, 137-142
- Krommer, C. F.; Szalai, J. P. (1992) Cyclophosphamide, adriamycin and cisplatin (CAP) versus cyclophosphamide, adriamycin and vincristine (CAV) in the treatment of advanced ovarian-cancer – a randomized study. *Ann. Oncol.* 3, 37-39

- Kuhn, W; Muller, T.; Grobe, H; Dierks, T. Rommelspacher, H. (1995) Plasma levels of the β -carbolines harman and norharman in Parkinson's disease, *Acta Neurol. Scand.* 92, 451-454
- Kupiec, M. (2000) Damage-induced recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 451, 91-105
- Le Curieux, F.; Marzin, D.; Erb, F. (1993) Comparison of the three short-term assays: results of seven chemicals. Potential contribution to the control of water genotoxicity. *Mutat. Res.* 319, 223-236
- Lee, C. S.; Han, E. S.; Jang, Y. Y.; Han, J. H.; Ha, J. H.; Kim, D. E. (2000) Protective effect of harmalol and harmaline on MPTP neurotoxicity in the mouse and dopamine-induced damage of brain mitochondria and PC12 cells. *J. Neurochem.* 75, 521-531
- MacGregor, J. T.; Casciano, D.; Müller, L. (2000) Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mutat. Res.* 455, 3-20
- Machida, I.; Nakai, S. (1980) Induction of spontaneous and UV-induced mutations during commitment to meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 73, 59-68.

- Madle, E.; Obe G.; Hansen, J.; Ristow, H. (1981) Harman and norharmane: induction of sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes in vitro and interaction with isolated DNA. *Mutat. Res.* 90, 433-442.
- McCoy, E. C.; Rosenkranz, E. J.; Petrullo, L. A.; Rosenkranz, H. S. (1981) Frameshift mutations: relative roles of simple intercalation and of adduct formation. *Mutat. Res.* 90, 21-30
- Meert, T. F. (1994) Pharmacological evaluation of alcohol withdrawal-induced inhibition of exploratory-behavior and supersensitivity to harmine-induced tremor. *Alcohol Alcoholism* 29, 91-102
- Meester C (1995) Genotoxic potencial of β -carbolines: a review. *Mutat Res.* 339, 139-153
- Meikle, I.; Cummings, J.; Macpherson, J. S.; Hadfield, J. A.; Smyth, J. F. (1995) Biochemistry of topoisomerase I and inhibition by anthracenylamino acid conjugates. *Biochem. Pharmacol.* 49, 1747-1757
- Melo, A. A.; Querol, C. B.; Henriques, A. T.; Henriques, J. A. P. (1986) Cytostatic, cytotoxic and mutagenic effects of vincristine and indole alkaloid in wild-type and repair-deficient yeasts. *Mutat. Res.* 171, 17-24
- Merk, O.; Speit, G. (1999) Detection of crosslinks with the comet assay in relationship

- to genotoxicity and cytotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.* 33, 167-172
- McKelvey-Martin, V. J.; Green, M. H. L.; Schmezer, P.; Pool-Zobel, B. L.; De Méo, M. P.; Collins, A. (1993) The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat. Res.* 288, 47-63
- Moreno, P. R. H.; Vargas, V. M. F.; Andrade, H. H. R.; Henriques, A.T.; Henriques, J. A. P. (1991) Genotoxicity of the boldine aporphine alkaloid in prokaryotic and eukaryotic organisms. *Mutat. Res.* 260, 145-152
- Moustacchi, E.; Favaudon, V.; Bisagni, E. (1983) Likelihood of the new antitumoral drug 10-[γ -diethylaminopropylamino]-6-methyl-5H-pyrido[3',4':4,5]pyrrolo[2,3-g]isoquinoline (BD-40), a pyridopyrroloisoquinoline derivate, to induce DNA strand breaks in vivo and its nonmutagenicity in yeast. *Cancer Res.* 43, 3700-3706
- Moustacchi, E. (1987) DNA repair in yeast: genetic control and biological consequences, In: *Advances in radiation research*. New York: Academic Press, pp. 1-30
- Müller, L.; Sofuni, T. (2000) Appropriate levels of cytotoxicity for genotoxicity tests using mammalian cells in vitro. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 202-205
- Murray, T. D.; Berger, A. (1997) Alcohol withdrawal. *Va Med. Q.* 124, 184-189

- Natarajan, A. T.(1984) Origin and significance of chromosomal alterations, In: Mutations in man. Obe, G.(Ed.) Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 156-176
- Natarajan, A. T.; Zwanengurg, T. S. B. (1982) Mechanisms for chromosomal aberrations in mammalian cells. *Mutat. Res.* 95, 1-6
- Nickoloff, C. E.; Hoekstra M. F. (1998) DNA damage and repair, Human Press, Totowa, New Jersey, USA.
- Oda, Y.; Nakamura, S-I.; Oki, I. (1988) Harman and norharman induce SOS responses and frameshift mutations in bacteria. *Mutat. Res.* 208, 39-44
- Olive, P. L.; Wlodek D.; Durant, R. E.; Banáth, J. P. (1992) Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp. Cell Res.* 198, 259-267
- Palitti, F. (1998) Mechanisms of origin of chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 404, 133-137
- Parshad, R.; Sanford, K. K. (2001) Radiation-induced chromatid breaks and deficient DNA repair in cancer predisposition. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 37, 87-96

- Parry, E. M.; Parry, J. M. (1984) The assay of genotoxicity of chemicals using the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Mutagenicity testing: A practical approach, Venitt, S.; Parry, S. M. (Eds.), ORL Press, Oxford, Washington DC
- Pasqual, M. S.; Lauer, C. P.; Moyna, P.; Henriques, J. A. P. (1993) Genotoxicity of the isoquinoline alkaloid berberine in prokariotic and eukariotic organisms. *Mutat. Res.* 286, 243-252
- Paula-Ramos, A. L. L.; Querol, C. B.; Marques, E. K.; Henriques, J. A. P. (1991) Cytotoxic activation of the pyrrolizidine alkaloid integerrimine in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is caused by repairable DNA damage. *Rev. Bras. Genet.* 14, 897-912
- Pelletier, S. W. (1983) The nature and definition of an alkaloid. In: *Alkaloids and Biological Perspectives*. John Wiley, New York, p.1-31
- Peres, A. (1999) Efeitos dos alcalóides harmina, harmalina, harmol, harmalol, harmano sobre a resposta proliferativa in vitro de linfócitos periféricos humanos estimulados por fitoemaglutinina. Dissertação de Mestrado, curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, UFRGS
- Petes, T. D.; Malone, R. E.; Symington, L. S. (1991) Recombination in yeast, in: J. R. Braach, J. R. Pringle, E. W. Jones (Eds) *Molecular and Cellular Biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plain-view, N. Y., pp.

407-521

Picada, J. N.; da Silva, K. V. C. L.; Erdtmann, B.; Henriques, A. T.; Henriques, J. A. P.

(1997) Genotoxic effects of structurally related β -carboline alkaloids. *Mutat. Res.* 379, 135-149

Pimpinella, G.; Palmery, M. (1995) Interaction of β -carbolines with central

dopaminergic transmission in mice: structure-activity relationships. *Neuroscience Lett.* 189, 121-124

Poli, P.; Buschini, A.; Candi, A.; Rossi, C. (1999) Bleomycin genotoxicity alteration by

glutathione and cytochrome P-450 cellular content in respiratory proficient and deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutagenesis* 14, 233-238

Poljak, L.; Käs, E. (1995) Resolving the role of topoisomerase II in chromatin structure

and function. *Trends Cell Biol.* 5, 348-354

Prakash, L.; Prakash, S. (2000) Nucleotide excision repair in yeast. *Mutat. Res.* 451, 13-

24

Ramotar, D.; Mansson, J-Y. (1996) *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair processes:

an update. *Mol. Cell Biochem.* 158, 65-75

Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M. (1997) *Farmacologia* 3.ed, Rio de Janeiro:

Guanabara Koogan, 692 p.

Reymon, D.; Viñas, M. H.; Camacho, J. J. (1999) Steady-state and time-resolved study of the proton-transfer fluorescence of harmine and 2-methyl-harmine in organic solvents. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 120, 85-91

Richardson, M. L.; Gangolli, S. (1994) The dictionary of substances and their effects, V. 4, pp. 743-744

Rivas, P.; Cassels, B. K. ; Morello, A.; Repetto, Y. (1999) Effects of some β -carboline on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 122, 27-31

Roca, J. (1995) The mechanisms of DNA topoisomerases. *TIBS* 20, 156-160

Rommelspacher, H.; Damm, H.; Straub, S.; Schmidt, G. (1984) Ethanol induces an increase of harman in the brain and urine of the rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 327, 107-113

Rommelspacher, H.; May, T.; Salewski, B. (1994) Harman (1-methyl-beta-carboline) is a natural inhibitor of monoamine oxidase type A in rats. *Eurp. J. Pharmacol.*, 252, 51-59

Rommelspacher, H.; Dufeu, P.; Schimdt, L. G. (1996) Harman and norharman in alcoholism: correlations with psychopathology and long-term changes. *Alcohol.*

Clin. Exp. Res. 20, 3-8

Rommelspacher, H.; Spies, C.; Dierkes, J. (2000) The allucinations-inducing effect of beta-carbolines. *Eurp. Psych.* 15, 266S-266S

Sasaki, Y. F.; Yamada, H.; Shimoi, K.; Kinae, N.; Tomita, I.; Matsumura, H.; Ohta, T.; Shirasu, Y. (1992) Enhancing effects of heterocyclic amines and β -carbolines on the induction of chromosome aberrations in culture mammalian cells. *Mutat. Res.* 269, 79-95

Sauvaigo, S.; Serres, C.; Signorini, N.; Emonet, N.; Richardson, M. J.; Cadet, J. (1998) Use of the single-cell gel electrophoresis assay for the immunofluorescent detection of specific DNA damage. *Anal. Biochem.* 259, 1-7

Shimoi, K.; Kawabata, H.; Tomita, I. (1992) Enhancing effect of heterocyclic amine and β -carbolines on UV or chemically induced mutagenesis in *E. coli*. *Mutat. Res.* 268, 287-295

Shen, L. L.; Baranowski, J.; Fostel, J.; Montgomery, D.; Lartey, A. (1992) DNA topoisomerases from pathogenic fungi: targets for the discovery of antifungal drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 2778-2784

Shi, C.-C.; Chen, S.-Y.; Wang, G.-J., Liao, J.-F.; Chen, C.-F. (2000) Vasorelaxant effect of harman. *Eurp. J. Pharmacol.* 390, 319-325

Silva, J. (1999) Biomonitoramento de regiões mineradoras de carvão do Rio Grande do Sul – avaliação da genotoxicidade através de roedores nativos. Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Silva, J.; Freitas, T. R. O.; Heuser, V.; Marinho J. R.; Erdtmann, B. (2000a) Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by Comet assay and Micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 270-278.

Silva, J, T. R. O. Freitas, V. Heuser, J. R. Marinho, G. Speit & B. Erdtmann (2000b) An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genet. Mol. Biol.* 23, 241-245

Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Scheider, E. L.(1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191

Singh, N. P.; Stephens, R. E. (1996) Microgel eletrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA eletrostretching. *Mutat. Res.* 383, 167-175

Singh, N. P. (2000) Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat. Res.* 455, 111-127

Slotkin, T. A.; Distefano, V. (1970) Cardiovascular and respiratory effects of Harmine.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133, 662-664

Speit, G.; Habermeier, B.; Helbig, R. (1994) Differences in the response to mutagens

between two V79 sublines. *Mutat. Res.* 325, 105-111

Speit, G.; Hartmann, A. (1996) Nachweis von Genotoxischen Umweltschadstoffen mit

dem "Comet Assay". In: Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg

(Projekt, Angewandte Ökologie). Ulm, 114 pp

Speit, G.; Hartmann, A. (1999) The Comet assay (single-cell gel test) – A sensitive

genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *DNA Repair Protoc.*

113, 203-212

Suzuki, H.; Ikeda, T.; Yamagishi, T.; Nakaike, S.; Nakane, S.; Ohsawa, M. (1995)

Efficient induction of chromosome-type aberrations by topoisomerase II inhibitors

closely associated with stabilization of the cleavable complex in cultured fibroblastic

cells. *Mutat. Res.* 328, 151-161

Taira, Z.; Kanzawas, C.; Dohara, S.; Ishida, S.; Matsumoto, M.; Sakiya, Y. (1997)

Intercalation of six-beta-carboline derivatives into DNA. *Jap. J. Toxicol. & Environ.*

Health 43, 83-91

- Takahashi-Hyodo, S. A.; Sakamoto-Hojo, E. T.; Takahashi, C. S. (1999) Interaction effects of 5-azacytidine with topoisomerase II inhibitors on CHO cells, as detected by cytogenetic analysis. *Mutat. Res.* 431, 13-23
- Terziyska, A.; Waltschewa, L.; Venkov, P. (2000) A new sensitive test based on yeast cells for studying environmental pollution. *Environm. Pollution* 109, 43-52
- Tice, R. R.; Ormiston, B. G.; Boucher, R.; Luke, C. A.; Paquette, D. S. (1988) Environmental biomonitoring with feral rodent species. Application of short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures (Sandhu, S.; Waters, M. D. Eds.) Plenum Publishing Cco., New York, pp. 175-180
- Tice, R. R.; Hayashi, M.; MacGregor, J. T.; Anderson, D.; Blakey, D. H.; Holden, H. E.; Kirsch-Vilders, M.; Oleson Jr., F. B.; Pacchierotti, F.; Preston, R. J.; Romagna, R.; Shimada, H.; Sutou, S.; Vannier, B. (1994) Report from the working group on the in vivo mammalian bone marrow chromosomal aberration test. *Mutat. Res.* 312, 305-312
- Tice, R. R. (1995) Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants. In: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change* (Butterworth, B. E.; Corkun, L. D.; Guzmán-Rincón, J. Eds.) Plenum Press, New York, pp. 69-79.
- Tohda, H.; Tada, M.; Sugawara, R.; Oikawa, A. (1983) Actions of amino- β -carbolines

on induction of sister-chromatid exchanges. *Mutat. Res.* 116, 137-147

Totsuka, Y.; Ushiyama, H.; Ushihara, J.; Sinha, R.; Goto, S.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K. (1999) Quantification of the co-mutagenic beta-carbolines, norharman and harman, in cigarette smoke condensates and cooked foods. *Cancer Lett* 143, 139-143

Tse, S. Y. H.; Mark, I-K.; Dickens, B. F. (1991) Antioxidative properties of harmane and β -carboline alkaloids. *Biochem. Pharmacol.* 42, 459-464

Tweedie, D. J.; Prough, R. A.; Burke, M. D. (1988) Effects of induction on the metabolism and cytochrome P-450 binding of harman and other β -carbolines. *Xenobiotica* 18, 785-796

Yamashita, K.; Ohgaki H.; Wakabayashi, K.; Nagao, M.; Sugimura, T. (1988) DNA adducts formed by the comutagens harman and norharman in various tissues of mice, *Cancer Lett.* 42, 179-183.

Wakabayashi, K.; Totsuka, Y.; Fukotome, K.; Oguri, A.; Ushiyama, H.; Sugimura, T. (1997) Human exposure to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines and comutagenic β -carbolines. *Mutat. Res.* 376, 253-259

Wang, J. C. (1996) DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem* 65, 635-692

- Wang, J. C. (1998) Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Quart. Rev. Biophys.* 31, 107-144
- Wassermann, K. (1994) Intragenomic heterogeneity of DNA damage formation and repair: a review of cellular responses to covalent drug DNA interaction. *Crit. Rev. Toxicol.* 24, 281-322
- Wehner, F. C.; Thiel, P. G.; Van Rensburg, S. J. (1979) Mutagenicity of alkaloids in the Salmonella/microsome system. *Mutat. Res.* 66, 187-190
- Wodarz, N.; Wiesbeck, G. A.; Rommelspacher, H.; Riederer, P.; Boning, J. (1996) Excretion of β -carbolines harman and norharman in 24-hour urine of chronic alcoholics during withdrawal and controlled abstinence. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 20, 706-710
- Zimmermann, F. K. (1975) Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 31, 71-86
- Zheng, W.; Wang, S.; Barnes, L. F.; Guan, Y.; Louis, E. D. (2000) Determination of harmane and harmine in human blood using reversed-phased high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Anal. Biochem.* 279, 12567-129