

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**AUTOXIDAÇÃO DA APOMORFINA E SEUS EFEITOS CITOTÓXICO  
E GENOTÓXICO EM PROCARIOTOS, EUCARIOTOS INFERIORES  
E EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS**

**Karina Ckless**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-  
Graduação em Bioquímica da  
UFRGS como requisito para  
obtenção do grau de Doutor em  
Ciências. Orientador: João Antonio  
Pêgas Henriques**

**Porto Alegre**

**1996**

**Ao meu pai,  
Marinho, à minha  
mãe, Seida e ao meu  
irmão, James, pelo  
carinho e estímulo.**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador João Antonio Pêgas Henriques pela orientação, apoio, amizade e pelas oportunidades de ampliação do conhecimento durante as várias etapas deste trabalho.

Aos meus queridos colegas de laboratório Marcos, Ferreira, Jane, Jenifer, Angélica, Eduardo, Cleide, Maria Elena, Cristina, Mirian, Suelen, Ayub, Ana Lúcia que por este longo tempo foram minha "família", segurando muitas barras e proporcionando muitos momentos de descontração e intercâmbio de idéias científicas.

Às bolsistas de iniciação científica Cleri Shirlei Mosmann e Susanly Candal Tso pelo apoio moral e pela colaboração indispensável nos experimentos em diferentes etapas deste trabalho.

Ao Dr. Martin Brendel pelas críticas e sugestões ao trabalho.

Aos professores Mirian S. Pasqual e M.N.R. Leygue-Alba pela colaboração científica e apoio neste trabalho.

À Dra. Maria Edwiges Hoffmann pela colaboração referente ao cultivo de células de mamíferos e, principalmente, pela receptividade em seu laboratório na UNICAMP, pela amizade e apoio moral indispensáveis para a realização deste trabalho e para meu crescimento científico e pessoal.

À colega da UNICAMP Nadja Cristhina de Souza-Pinto pela colaboração científica, e principalmente pela amizade e estímulo tão necessários durante a realização deste trabalho.

Aos demais colegas e amigos da UNICAMP pela receptividade e momentos de descontração durante o estágio realizado na referida universidade.

Ao colega e amigo Bóris Stambuk pelas críticas e sugestões ao trabalho.

Aos demais colegas e amigos da Universidade Federal de Santa Catarina pelo carinho, compreensão e estímulo na difícil finalização deste trabalho.

À Ariana pela revisão dos textos em inglês.

Ao Afonso, companheiro e amigo pelo carinho, amor e compreensão indispensáveis durante as difíceis etapas deste trabalho.

A todos aqueles familiares, amigos, colegas, professores e funcionários que direta ou indiretamente colaboraram para realização deste trabalho e possibilitaram esta conquista, pois ninguém consegue crescer sozinho.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Radiobiologia Molecular do Centro de Biotecnologia do Instituto de Biociências da UFRGS e no Laboratório de Toxicidade Celular e Molecular do Departamento de Bioquímica da UNICAMP. Este projeto de pesquisa foi subvencionado pelo Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pelo Laboratório de Genotoxicidade (Genotox) do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

## ÍNDICE

	Página
1. Introdução .....	1
1.1. Apomorfina .....	1
1.2. Espécies reativas de oxigênio .....	3
1.3. Algumas fontes de radicais de oxigênio em sistemas biológicos .....	7
1.2.2. Antioxidantes .....	9
1.2.2.1. Antioxidantes não enzimáticos .....	9
1.2.2.2. Antioxidantes enzimáticos .....	10
1.3. Biotransformação .....	12
1.3.1. Biotransformação não enzimática .....	13
1.3.2. Biotransformação enzimática .....	14
1.3.3. Toxicidade de quinonas e semiquinonas .....	15
1.4. Testes para avaliação toxicológica .....	17
1.4.1. Teste de longa duração .....	18
1.4.2. Teste de curta duração .....	18
1.4.2.1. Testes em sistema procarioto - Salmonella/microsoma (Teste de Ames) .....	19
1.4.2.2. Testes em sistema eucarioto - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	21
1.4.2.2.1. Alguns aspectos sobre bioquímica e fisiologia de leveduras ..	21
1.4.2.2.2. Testes de mutação reversa “forward mutation”, conversão gênica e recombinação mitótica (crossing over) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	24
1.4.2.3. Ensaio com células de mamíferos .....	28
1.4.2.3.1. Ensaios de toxicidade e proliferação celular em fibroblastos de pulmão de Hamster chinês - células V79 .....	29
2. Objetivos .....	31

3. Capítulo 1 - Apomorphine: chemical studies and mutagenic response in the Salmonella mutagenicity assay .....	33
4. Capítulo 2 - Cytotoxic and genotoxic effects of apomorphine on <i>Saccharomy- ces cerevisiae</i> strains: involvement of fermentative and oxidative metabolism .....	56
5. Capítulo 3 - Autoxidation and cytotoxicity of apomorphine: involvement of iron and hydrogen peroxide .....	81
6. Discussão Geral.....	107
7. Conclusões .....	113
8. Perspectivas .....	115
9. Referências bibliográficas.....	118
10. Resumo.....	126
11. Summary.....	128

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1. Obtenção da apomorfina, através de reação catalisada por HCl concentrado .....	1
Figura 2.1. Oxidação da apomorfina, gerando sua <i>o</i> -quinona correspondente... 2	2
Figura 3.1. Possíveis rotas de oxiredução de semiquinonas em sistemas biológicos .....	17
Figure 1.3. Obtention of apomorphine from morphine, through acid-catalyzed reaction .....	51
Figure 2.3. Time-dependent APO (1mM) decomposition .....	52
Figure 3.3. Time-dependent APO (1mM) decomposition in the presence of S9 mix cofactors .....	53
Figure 4.3. Induction of HIS <sup>+</sup> revertants in <i>Salmonella typhimurium</i> TA97, TA98 and TA102 by APO in the presence of metabolization (S9 mix) .....	54
Figure 5.3. Induction of HIS <sup>+</sup> revertants in <i>Salmonella typhimurium</i> TA97, TA98 and TA102 by APO in the absence of metabolization (S9 mix) .....	55
Figure 1.4. Cytotoxic effect of apomorphine in diploid <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain XS2316 .....	80
Figure 1.5. Kinetics of APO degradation .....	100
Figure 2.5. Effect of iron on the kinetics of APO autoxidation .....	101
Figure 3.5. Kinetics of oxygen consumption by APO .....	102
Figure 4.5. Effect of iron on superoxide anion radical production during APO autoxidation .....	103
Figure 5.5. Inhibition of cell proliferation by APO .....	104
Figure 6.5. Effect of iron in APO-induced inhibition of cell proliferation ...	105



Figure 7.5. Production of APO corresponding *o*-quinone by a mechanism involving semiquinone generation .....106

Figura 1.6. Modelo proposto para a oxidação da apomorfina *in vitro* ..... 108

## LISTA DE TABELAS

Página

TABLE 1.4. INDUCTION OF FRAMESHIFT (*hom3-10*) AND POINT MUTATION (*lys1-1; his1-7*) IN HAPLOID STRAIN XV185-14c OF *S. cerevisiae* AFTER APOMORPHINE TREATMENT ..... 76

TABLE 2.4. INDUCTION OF CROSSING-OVER (+*cyh*) AND GENE CONVERSION (*leu1-1/leu1-12*) IN DIPLOID STRAIN XS2316 OF *S. cerevisiae* AFTER APOMORPHINE TREATMENT ..... 77

TABLE 3.4. INDUCTION OF CROSSING-OVER (+*cyh*) AND GENE CONVERSION (*leu1-1/leu1-12*) IN EARLY EXPONENTIAL AND EXPONENTIAL PHASE OF DIPLOID STRAIN XS2316 OF *S. cerevisiae* AFTER APOMORPHINE TREATMENT IN THE PRESENCE OF GLUTATHIONE (100 µg/ml) ..... 78

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 APOMORFINA

Apomorfina (APO) é um derivado sintético da morfina, obtido através de uma reação catalisada por ácido clorídrico concentrado (Fig. 1.1) (NEUMEYER, 1985). Conhecido desde 1869, este alcalóide foi utilizado inicialmente devido as suas propriedades eméticas (SHAMA, 1972). Sua ação se dá através do estímulo da CTZ (“chemoreceptor trigger zone”), ativando diretamente receptores dopaminérgicos, provocando emese em 3 a 5 minutos (CANNON *et al.*, 1972; MCKENZIE & WHITE, 1973; RÍOS *et al.*, 1989). Por este motivo, a APO é utilizada em pacientes com ingestão oral de certos agentes tóxicos. Devido a sua ação sob o sistema nervoso central, altas doses de APO pode provocar efeito hipnótico, além disso seu uso contínuo pode causar euforia, e tremores (GILMAN *et al.*, 1991).

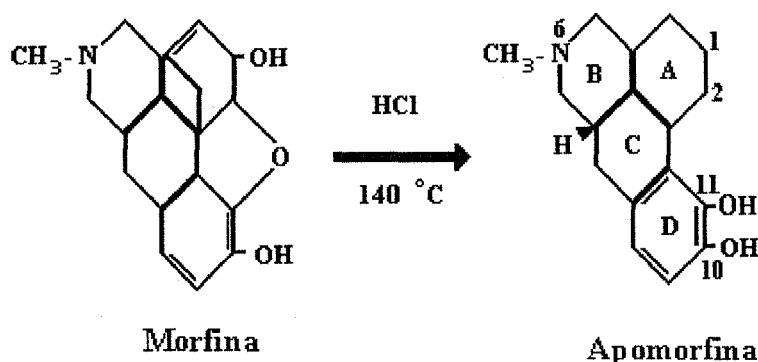


Figura 1.1. Obtenção da apomorfina, através de reação catalisada por HCl concentrado.

Este composto pertence ao grupo de alcalóides benzilisoquinólicos. Sua estrutura bifenilica apresenta no anel aromático D, duas hidroxilas vicinais no carbono 10 (C-10) e carbono 11 (C-11), formando um anel catecólico (Fig. 1-1) (SHAMA, 1972; CASSELS *et al.*, 1995).

A estrutura catecólica, juntamente com o nitrogênio metilado pertencente ao anel B, conferem a apomorfina similaridade estrutural com a dopamina (CANNON *et al.*, 1972). Devido a estas características estruturais este alcalóide tem sido utilizado no tratamento do mal de Parkinson. APO difere de outros agonistas dopaminérgicos por sua não seletividade, estimulando tanto receptores D1 quanto D2 (GANCHER, 1995). A grande restrição ao seu uso sistemático no tratamento desta doença se deve a sua instabilidade em fluidos biológicos, além do efeito emético já mencionado. Esta substância, em soluções neutras, é facilmente degradada em presença de oxigênio molecular (SAM *et al.*, 1994), sendo que esta degradação aumenta proporcionalmente ao aumento de pH. O produto da sua autooxidação, provavelmente sua forma quinônica, apresenta coloração verde escuro (Fig. 2.1) (SHAMMA, 1972; SAM *et al.*, 1994).

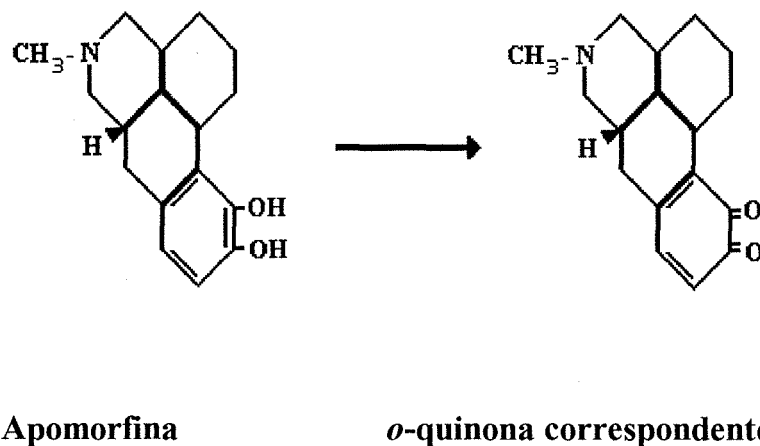


Figura 2.1. Oxidação da apomorfina, gerando sua *o*-quinona correspondente.

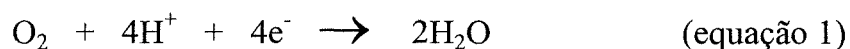
A correlação entre os mecanismos de autoxidação e ação tóxica da apomorfina ainda não está claramente estabelecida. Alguns estudos referentes aos efeitos deletérios provocados pela apomorfina em sistemas biológicos ou *in vitro* tem demonstrado que o assunto é controverso. SUTER & MATTER-JAEGER (1984) verificaram que esta substância apresenta atividade genotóxica em bactérias. Sua autoxidação gera produtos mutagênicos, os quais induzem mutações que alteram a sequência de leitura do DNA (mutações frameshift) em *Salmonella typhimurium*. Recentemente, UBEDA *et al.* (1993) demonstraram que APO é capaz de estimular danos ao DNA induzidos por  $\text{Cu}^{2+}$  e degradação de deoxirribose induzida por  $\text{Fe}^{3+}$ , desta forma, agindo como pro-oxidante. Por outro lado, este alcalóide mostrou efeito inibitório da peroxidação lipídica induzida por  $\text{Fe}^{3+}$ , possuindo, neste caso, propriedades antioxidantes (MARTINEZ *et al.*, 1992; UBEDA *et al.*, 1993). Neste contexto, MORELLO e colaboradores (1994) demonstraram que este alcalóide possui potente atividade tripanocida quando comparado com outros alcalóides benzilisoquinolínicos, tais como boldina e glaucina.

## 1.2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

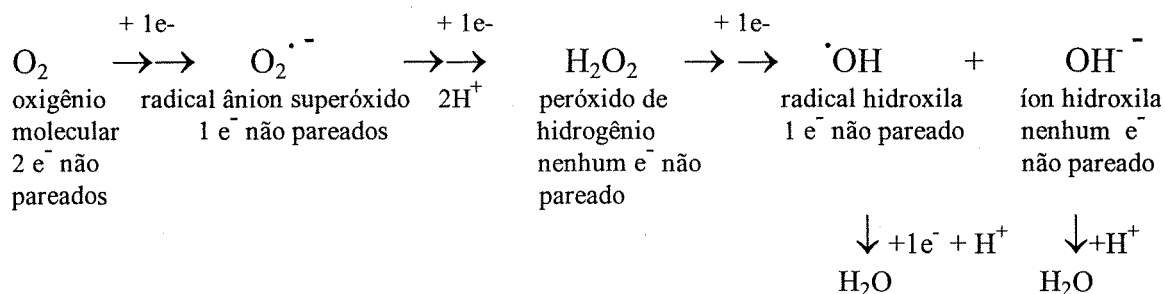
Na estrutura atômica, os elétrons ocupam regiões denominadas orbitais. Cada orbital pode conter no máximo dois elétrons, deslocando-se em trajetórias opostas. Quando um átomo ou molécula apresentar um ou mais elétrons não pareados fica caracterizada uma espécie radicalar (HALLIWELL, 1991). Este

elétron não pareado confere à molécula propriedades físicas e químicas especiais. Quimicamente, o elétron não pareado aumenta a reatividade molecular; ao passo que, fisicamente, pode formar um campo magnético, conferindo à molécula propriedades paramagnéticas (HOLEMBERG, 1984).

O oxigênio na forma atômica (O) possui um elétron não pareado em seu último orbital atômico, conferindo-lhe caráter radicalar. Quando dois átomos de oxigênio se combinam quimicamente, permanecem ambos com seus elétrons desemparelhados, devido a restrições de spins. Desta forma, o oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) possui dois elétrons não pareados, sendo classificado como um bi-radical (DAVIES, 1994). Esta característica bi-radicalar, confere ao oxigênio molecular a capacidade de absorver energia eletromagnética a qual pode temporariamente inverter o sentido (spin) de um dos dois elétrons não pareados. Momentaneamente, esta molécula denominada de oxigênio singlet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), não apresenta restrições de spins, podendo agir como um potente oxidante (DAVIES, 1994). Além disso, o O<sub>2</sub> participa eficientemente de reações de oxirreduções em sistemas biológicos. A redução total do oxigênio molecular leva à formação de água (equação 1). Este processo ocorre normalmente nas células aeróbicas, através de reações bieletrônicas, durante o transporte de elétrons na cadeia respiratória (DAVIES, 1994).

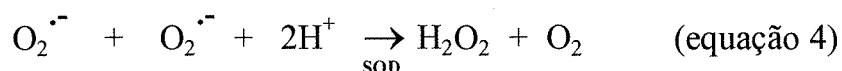
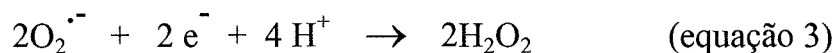


Sucessivas reduções monoelétrônicas desta molécula produzem diferentes intermediários parcialmente reduzidos (equação 2) (FRIDOVICH, 1983; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984).



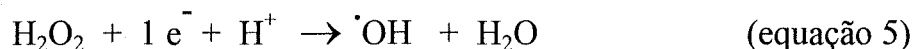
(equação 2)

O radical ânion superóxido é produto da redução monoelétrica do oxigênio molecular. Em solventes orgânicos, este radical é extremamente reativo, sendo que em soluções aquosas esta reatividade diminui significativamente (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984). A dismutação do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  produz  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sendo que esta reação pode ocorrer espontaneamente (equação 3) ou ser catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (equação 4). Desta forma, a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ocorrer em consequência da formação de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (FARBER *et al.*, 1990).

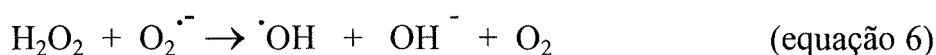


Peróxido de hidrogênio não apresenta elétrons desemparelhados, portanto não é considerado um radical (HALLIWELL, 1991). Entretanto, quando esta espécie é reduzida forma o radical hidroxila. Este radical é extremamente reativo, podendo provocar sérios danos às células, através de oxidação de

biomoléculas que estão localizadas próximo aos seus sítios de formação (equação 5) (KAPPUS, 1987; HALLIWELL & ARUOMA, 1991).

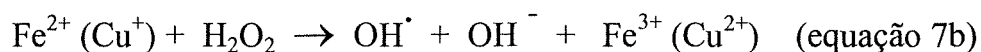
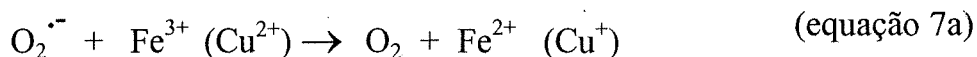


Os equivalentes redutores para a redução do peróxido de hidrogênio podem ser originados a partir do radical íon superóxido, através da reação de Haber-Weiss (equação 6).



Esta reação é termodinamicamente favorável, mas cineticamente lenta. Em sistemas biológicos, existem catalisadores que aceleraram este processo. Metais de transição, tais como ferro e cobre ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^+$ ), aumentam a velocidade da produção  $\cdot\text{OH}$ , indiretamente aumentando a toxicidade do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). A reação envolvendo metais ocorre em etapas, onde primeiramente os íons férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ou cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) são reduzidos pelo radical superóxido, produzindo íons ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ou cuproso ( $\text{Cu}^+$ ) e oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) (equação 7a). Estes íons reagem rapidamente com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gerando, desta forma, radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), íon hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) e  $\text{Fe}^{3+}$ . Esta reação é conhecida como reação de Fenton e está representada na equação 7b (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).





Por fim, a redução monoelétrica do radical hidroxila, origina a molécula de água (equação 8).



Os radicais de oxigênio, quando não inativados, são capazes de oxidar diferentes biomoléculas, tais como proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucléicos (RNA e DNA), comprometendo desta forma, a integridade celular (ZHANG *et al.*, 1990). Quando há um desbalanço entre pró-oxidantes e antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos) em favor dos primeiros, levando à condição de dano em potencial, há a caracterização de estresse oxidativo (SIES, 1991). Tal definição, incorpora os produtos celulares oxidados como parâmetros indicadores de estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode estar relacionado com vários processos tais como, mutagênese, carcinogênese, doenças degenerativas e envelhecimento (SIES, 1986; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990).

### **1.2.1. Algumas Fontes de Radicais de Oxigênio em Sistemas Biológicos**

A produção de radicais de oxigênio é permanente dentro de um sistema biológico. O transporte de elétrons ao longo da cadeia respiratória é

reconhecido como principal fonte de espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas durante o metabolismo oxidativo normal (ZHANG *et al.*, 1990; GARCÍA-RUIZ *et al.*, 1995). Uma célula aeróbica utiliza o oxigênio molecular para a obtenção de energia química em forma de adenosina trifosfato (ATP), em processos acoplados chamados de, respectivamente, cadeia respiratória e fosforilação oxidativa. Durante o transporte de elétrons ocorrem sucessivas reações de oxireduções que irão reduzir o oxigênio molecular à água. Na maioria das vezes (95%), as reações são bieletrônicas (BUECHTER, 1988; GARCÍA-RUIZ *et al.*, 1995). Em uma pequena quantidade podem ocorrer reações monovalentes, ou seja, em algum estágio da cadeia respiratória um acceptor de elétrons pode receber apenas um elétron (SOUTHORN & POWIS, 1988). A ubiquinona, proteína localizada na membrana interna da mitocôndria que pertence ao sítio II da cadeia respiratória, pode apresentar-se em três estados de oxidação: forma oxidada (ubiquinona - Q), forma reduzida (ubiquinol - QH<sub>2</sub>) e forma radical (intermediário semiquinona - QH<sup>•</sup>), esta última, indicando uma redução monoelétrica (GARRET & GRISHAM, 1995). O processo inflamatório é outro exemplo característico de geração de ERO, e até certo ponto benéfico para o organismo. Durante este processo, fagócitos, monócitos, bem como outras células do sistema imunológico aumentam significativamente a sua respiração e conseqüentemente o consumo de oxigênio, gerando grande quantidade de radical ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Esta espécie radical exerce um papel fisiológico extremamente importante no mecanismo de defesa contra infecções, pois sua dismutação gera peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (SOUTHORN & POWIS, 1988). Uma vez formados, estes dois agentes

oxidantes ( $O_2^{\cdot -}$  e  $H_2O_2$ ) geram espécies químicas que serão responsáveis pela ação bactericida destas células do sistema imunológico (CURNUTTE & BABIOR, 1987).

### **1.2.2. Antioxidantes**

Durante o processo evolutivo a presença de oxigênio, que era extremamente tóxica aos organismos, passou gradativamente a ser “tolerável”. Os organismos aeróbicos desenvolveram diferentes mecanismos de defesa antioxidante, enzimáticos e não enzimáticos, que podem prevenir a formação das ERO, bem como reagir com estes, anulando seu efeito oxidativo (SIES, 1993).

HALLIWELL & GUTTERIDGE (1989) definem como antioxidante “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas às de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato”. Esta definição compreende sistemas enzimáticos e não enzimáticos.

#### **1.2.2.1. Antioxidantes não enzimáticos**

Existem várias moléculas que podem agir como antioxidantes interceptadores não enzimáticos. Tocoferóis (em especial o  $\alpha$ -tocoferol) e tocotrienóis, ácido ascórbico (vitamina C), assim como carotenóides reagem

com ERO, principalmente radicais peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e com oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ). O *RRR*- $\alpha$ -tocoferol é o principal sequestrador de radicais  $\text{ROO}^\bullet$  localizado nas membranas e lipoproteínas de baixa densidade (LDL). O L-ascorbato está presente no citoplasma e outros fluídos corporais, onde pode reduzir o radical tocoferil. Uma vez oxidadas, estas moléculas são regeneradas pelos sistemas não radicalares como glutathiona reduzida/glutathiona oxidada (GSH/GSSG), dihidrolipoato/lipoato, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido/oxidado ( $\text{NADPH/NADP}^+$ ) e nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido/oxidado ( $\text{NADH/NAD}^+$ ). Carotenóides, como por exemplo o  $\beta$ -caroteno e o licopeno exercem funções antioxidantes nas fases lipídicas, destruindo  $^1\text{O}_2$  e liberando energia na forma de calor, sem a necessidade de um sistema que os regenere (SIES *et al.*, 1992).

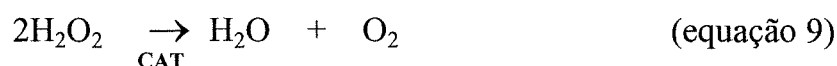
#### 1.2.2.2. Antioxidantes enzimáticos

Todas as células possuem um eficiente sistema enzimático antioxidante. As três principais enzimas são as superóxido dismutases (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (Gpx).

A enzima SOD catalisa a dismutação do radical  $\text{O}_2^{\bullet -}$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$  (MCCORD & FRIDOVICH, 1969), conforme a equação 4, representada anteriormente. Esta enzima é encontrada em todos os organismos aeróbicos em diferentes isoformas. A cobre, zinco-SOD (Cu,Zn-SOD) é encontrada principalmente no citoplasma de todas células eucarióticas, mas geralmente não

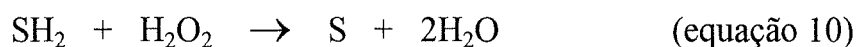
é encontrada em procariotos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). As outras isoformas da SOD são a manganês-SOD (Mn-SOD) e a ferro-SOD (Fe-SOD) (WANDERS & DENIS, 1992). A Mn-SOD é encontrada em muitas bactérias e nos extratos tissulares de animais e plantas, sendo que no homem sua localização é mitocondrial. A Fe-SOD é encontrada em algumas bactérias e cloroplastos de alguns vegetais (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

A CAT decompõe o  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular (equação 9) (FARBER *et al.*, 1990).



Com exceção de algumas bactérias, algas verdes e azuis e alguns parasitas helmintos, a maioria das células aeróbicas possuem atividade catalásica. A catalase nos tecidos animais e vegetais encontra-se predominantemente em organelas subcelulares, os peroxisomas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

As peroxidases são enzimas que utilizam doadores de elétrons para reduzir peróxido de hidrogênio, produzindo água (equação 10) (LITTLE & O'BRIEN, 1968; CHRISTOPHERSEN, 1969).



A mais importante peroxidase é a glutathiona peroxidase (Gpx), enzima que possui selênio no sítio catalítico e utiliza a glutathiona reduzida (GSH) como doador de elétrons para a redução de  $H_2O_2$  e de outros peróxidos orgânicos, tais como lipoperóxidos provenientes da lipoperoxidação lipídica, impedindo assim a fase de propagação deste processo (KEELING & SMITH, 1982). A Gpx está presente em vários tecidos animais e geralmente não ocorre em vegetais superiores e bactérias, embora já tenha sido descrita em fungos e algas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Durante o processo catalisado pela Gpx ocorre a oxidação de GSH, formando uma ponte dissulfeto entre duas moléculas de glutathiona (GSSG). A relação entre GSH/GSSG deve ser alta para a manutenção do poder redutor intracelular (KAPPUS, 1986). Nas células normais isto ocorre pela presença de enzimas acessórias. Dentre estas, a glutathiona redutase (GR), que utiliza elétrons do NADPH para a redução de pontes dissulfeto, restabelecendo assim, os níveis de GSH (REED, 1986).

### 1.3. BIOTRANSFORMAÇÃO

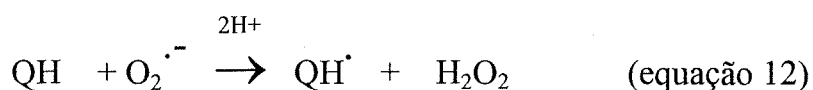
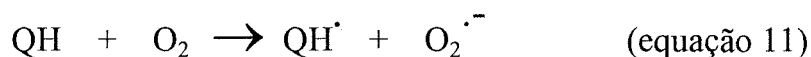
Muitos compostos endógenos e exógenos podem ser oxidados/reduzidos enzimaticamente ou não enzimaticamente, gerando intermediários quimicamente reativos (TRUSH *et al.*, 1982). Em geral, estes compostos são metabolizados por enzimas intracelulares (redutases/oxidases de vários tipos) em reações monoeletrônicas, onde há consumo de  $O_2$  e depleção de equivalentes redutores ( $e^-$ ), principalmente do NADPH. Dentre os compostos

que são capazes de participar do ciclo redox incluem aqueles que apresentam grupamentos catecólicos e quinônicos (KAPPUS & SIES, 1981).

Catecóis e quinonas em soluções fisiológicas podem ser respectivamente oxidados e reduzidos em reações monoelétrônicas, levando à formação de radical superóxido e respectivo radical semiquinona (ISHII & FRIDOVICH, 1990; HASTINGS & ZIGMOND, 1994), sendo que estas reações dependem do potencial redox destas moléculas (KAPPUS, 1986). O radical semiquinona pode ser produzido de várias maneiras, através de reações não enzimáticas e enzimáticas. (WARDMAN *et al.*, 1995).

### **1.3.1. Biotransformação não enzimática**

O passo inicial para a autooxidação de catecóis, catecolaminas e outras hidroquinonas envolve a transferência de elétrons do grupamento catecólico ou hidroquinônico para o oxigênio molecular (equação 11) (KALYANARAMAN, *et al.*, 1985). O radical ânion superóxido formado na etapa inicial da autooxidação de catecolaminas, também pode reagir novamente com a forma reduzida deste composto (equação 12) (MASON, 1990).



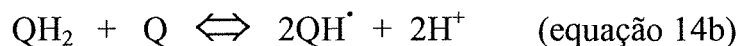
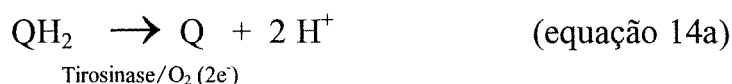
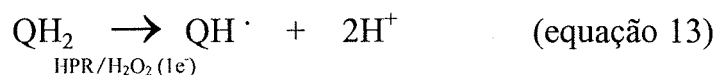
Esta transferência de elétrons de grupamentos catecólico ou hidroquinônico para o oxigênio molecular pode ser mediada por metais de transição presentes em sistemas biológicos (MILLER *et al.*, 1990) Peróxidos de benzoila, quercetina e outros flavonóides podem ser ativados por estes metais, neste caso o  $\text{Cu}^{2+}$ , envolvendo reações do tipo ciclo redox, levando a formação de ERO e outros radicais orgânicos (AHMAD *et al.*, 1992). A oxidação de hidroquinonas formando benzoquinona e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , através de mecanismo envolvendo ciclo redox de  $\text{Cu}^{2+}$ , foi recentemente descrita por LI & TRUSH (1994). O grupamento catecólico do estradiol também é oxidado em presença de  $\text{Cu}^{2+}$  num processo que gera ERO, provocando danos oxidativos ao DNA, detectado por quebras de cadeia no plasmídeo  $\phi\text{X-174}$  (LI *et al.*, 1994). Os processos de oxidação envolvendo metais de transição são bastante comuns, pois tais metais, como  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , são elementos essenciais às células, uma vez que fazem parte do centro ativo de uma série de metaloproteínas, além de estar associados a bases do DNA (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990).

### **1.3.2. Biotransformação enzimática**

A formação de radicais semiquinona através de enzimas pode ocorrer por reações bi ou monovalentes, através da redução de uma quinona ou oxidação de um catecol. Enzimas capazes de oxidar catecol(aminas), estrógenos e fenóis *in vitro* incluem citocromo P450/NADPH, "horseradish" peroxidase (HRP)/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , ácido araquidônico/prostaglandina sintetase (PG sintetase), catalase/ $\text{H}_2\text{O}_2$  e tirosinase/ $\text{O}_2$ . A redução de quinonas pode ocorrer



através das enzimas NADPH citocromo P-450 redutase, DT-diaforase e xantina/xantina oxidase (KALYANARAMAN *et al.*, 1985; LIEHR & ROY, 1990). A oxidação de catecóis e catecolaminas catalisada pela HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> envolve obrigatoriamente a formação de uma semiquinona (equação 13), enquanto que a oxidação catalisada pela tirosinase é bieletrônica, sendo que a formação de radical semiquinona ocorre em uma reação secundária (equações 14a e b) (KALYANARAMAN *et al.*, 1985). Em sistemas biológicos, esta reação secundária (equação 14b) ocorre somente quando há um equilíbrio, dependente de pH, das formas oxidadas e reduzidas (WARDMAN *et al.*, 1995).



### 1.3.3. Toxicidade de quinonas e semiquinonas

As quinonas apresentam três propriedades químicas de fundamental importância biológica. Quinonas são oxidantes, eletrofílicas, e podem absorver energia luminosa (UV e visível). Desta forma, podem ser tóxicas às células por uma variedade de mecanismos, incluindo participações em reações tipo redox, arilações, ligações com DNA induzindo quebras de cadeia simples e dupla, além de interferência na respiração mitocondrial. A inativação de enzimas e proteínas por quinonas é devido a reações de adição nucleofílica a grupos sulfidrila de aminoácidos presentes nestas biomoléculas (MONKS *et al.*, 1992).

Conjugações entre quinonas e proteínas formam as “melano-proteínas” (MASON & PETERSON., 1965), que são responsáveis pelas “reações marron” que ocorrem nas frutas e vegetais (HURREL *et al.*, 1984). O envolvimento de catecolaminas endógenas, como por exemplo a dopamina, com processos degenerativos do sistema nervoso central é devido a mecanismos oxidativos, onde há a geração da quinona correspondente e conseqüente formação de neuromelanina (GRAHAM, 1978; HASTINGS & ZIGMOND, 1994; KLEGERIS *et al.*, 1995; NEWCOMER *et al.*, 1995).

A toxicidade de semiquinonas pode se manifestar pela própria reatividade destes compostos com outras biomoléculas, bem como pela capacidade de reagirem com oxigênio molecular ( $O_2$ ), formando radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e regenerando a quinona parental, a qual estará novamente disponível para participar de reações do tipo ciclo redox (MONKS *et al.*, 1992). Da mesma forma, esta semiquinona pode ser reduzida e formar a hidroquinona/catecol que poderá sofrer oxidação, enzimática ou não, e também participar de reações do tipo redox (Figura 3.1).

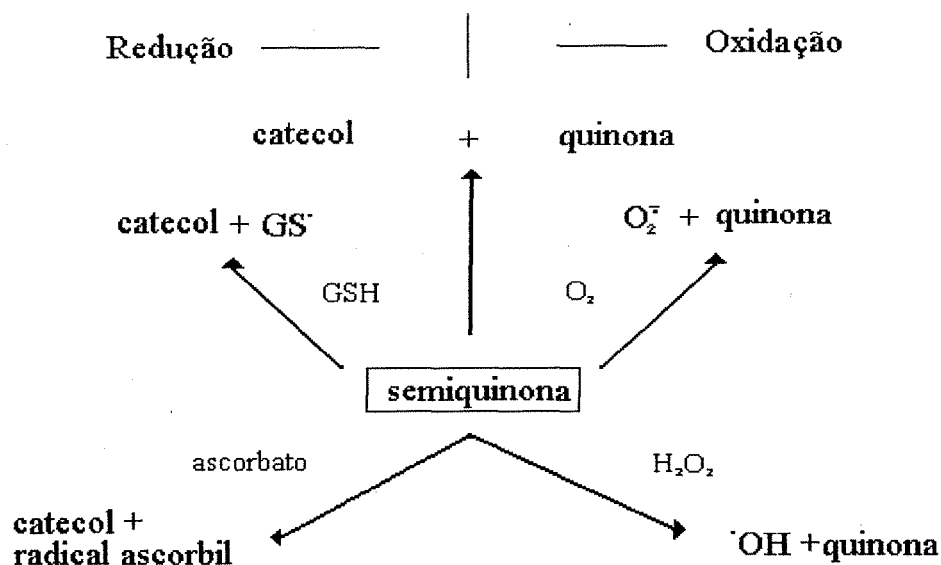


Figura 3.1. Possíveis rotas de oxiredução de semiquinonas em sistemas biológicos (KALYANARAMAN *et al.*, 1985).

#### 1.4. TESTES PARA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

De um modo geral, a toxicidade de uma substância pode ser definida como sua capacidade de causar danos a um tecido ou organismo vivo (AMES, 1989). A escolha e seqüência de testes de toxicidade dependerá das questões a serem respondidas ou objetivos a serem alcançados (para revisão ver LOHMAN *et al.*, 1992). Baseado nesta premissa, foi desenvolvida uma série de testes de toxicidade para avaliação sistemática de efeitos tóxicos de substâncias químicas, como agrotóxicos, aditivos alimentares, bem como medicamentos. Dentre os testes mais utilizados nas últimas décadas estão os procedimentos para avaliação de genotoxicidade e carcinogenicidade de substâncias. Estes testes dividem-se basicamente em dois tipos: testes de longa duração e testes de curta duração ou testes rápidos.

#### **1.4.1. Testes de Longa duração**

Nos testes de longa duração empregam-se principalmente roedores devido a sua susceptibilidade à indução tumoral, tempo de vida relativamente curto, fácil manutenção dos biotérios e grande disponibilidade de informações a respeito de sua fisiologia e patologias (WEISBURGER, 1975). Entretanto, é importante ressaltar que os resultados obtidos nestes sistemas teste, nem sempre são diretamente aplicados aos seres humanos (ZIMMERMANN *et al.*, 1984).

#### **1.4.2. Testes de Curta Duração**

Os testes de curta duração são procedimentos que não têm como objetivo o desenvolvimento de tumores *in vitro*. Na prática, a extrapolação dos ensaios de curta duração para determinação de carcinogenicidade implica na comparação de mutagenicidade com carcinogenicidade animal e esta com carcinogenicidade humana. Um agente mutagênico, químico ou físico, é aquele que induz a uma alteração genética que é transmitida através de gerações subsequentes (ZIMMERMANN *et al.*, 1984). Nestes ensaios é analisada, essencialmente, a capacidade dos agentes químicos ou físicos interagirem com o DNA, induzindo aberrações cromossômicas e mutagênese e como consequência, sua capacidade de induzirem a formação de tumores. A correlação entre alterações genéticas e o desenvolvimento de tumores não está totalmente esclarecida, apesar da concordância de 70% entre os testes de curta

duração *in vitro* e os testes de longa duração *in vivo* (ZIEGER, 1987; ASHBY & TENNANT, 1988; CLAYSON & ARNOLD, 1991).

Nos testes de curta duração são empregados microrganismos procariotos e eucariotos, bem como cultura de células de mamíferos. Como consequência, estes testes são mais rápidos, fáceis e acessíveis, levando vantagem sobre os testes de longa duração. Os testes rápidos podem ser utilizados basicamente em três circunstâncias: (a) para identificar substâncias mutagênicas e/ou potencialmente carcinogênicas; (b) como seleção de agentes químicos ou físicos a serem submetidos a testes de longa duração e (c) como estudo de ação tóxica de compostos químicos. Apesar da grande reprodutibilidade dos testes de curta duração, sugere-se a utilização de mais de um tipo de microrganismo, para aumentar a credibilidade da avaliação da substância que está sendo testada (AMES, 1989; LOHMAN *et al.*, 1992).

#### **1.4.2.1. Testes em Sistema Procarioto - Salmonella/Microsoma (Teste de Ames)**

O teste de Ames foi desenvolvido por Bruce Ames e seus colegas (AMES *et al.*, 1973), sendo largamente utilizado para determinação de substâncias mutagênicas e/ou potencialmente carcinogênicas. Este sistema utiliza uma linhagem da bactéria *Salmonella typhimurium* modificada geneticamente, o qual é auxotrófico para o aminoácido histidina. A determinação de mutagenicidade de um dado agente é baseada na capacidade

de esta substância induzir a reversão do operon da histidina (mutação reversa), restaurando a função normal deste gene, tornando o microrganismo capaz de sintetizar este aminoácido novamente (MARON & AMES, 1983; HENRIQUES *et al.*, 1987). Convém ressaltar que linhagens de *Salmonella typhimurium* apresentam mutações espontâneas, isto é algumas bactérias da população podem sintetizar novamente o aminoácido histidina, sem a indução de qualquer agente. Cada linhagem possui sua taxa de mutação espontânea, que de alguma forma pode interferir na avaliação do potencial mutagênico da substância em questão. Portanto, o potencial mutagênico de uma substância é dado pela o número de colônias revertentes, com valores duas vezes superiores ao da taxa de reversão espontânea, por concentração de produto testado. Além disso, é necessário o delineamento de uma curva-dose resposta, para que a substância em questão seja considerada mutagênica (MARON & AMES, 1983; TENENBAUM & MALAVEILLE, 1988; KIRKLAND *et al.*, 1994)

Além da modificação no gene da histidina, as linhagens bacterianas utilizadas no teste de Ames apresentam outras alterações. Para aumentar a sensibilidade da *S. typhimurium*, o gene *uvrB* foi deletado, tornando as linhagens deficientes no mecanismo de reparação por excisão e ressíntese de lesões produzidas no DNA. A passagem de grandes moléculas para dentro da célula foi facilitada, alterando-se a permeabilidade da parede celular. O plasmídeo pKM101, presente em algumas linhagens aumenta a mutagênese SOS (por ativação do sistema de reparação do DNA sujeito a erro), uma vez que contém os genes *mucAB* alelos do *umuCD* (MARON & AMES, 1983; OHTA

*et al.*, 1984; HENRIQUES *et al.*, 1987; RABELLO-GAY *et al.*, 1991). Cada linhagem desenvolvida apresenta características próprias para a determinação de mutagenicidade de cada grupo de substâncias químicas a ser testado (para revisão, ver MARON & AMES, 1983).

#### **1.4.2.2. Testes em Sistemas Eucarioto - *Saccharomyces cerevisiae***

##### **1.4.2.2.1. Alguns aspectos sobre bioquímica e fisiologia de leveduras**

A Levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo unicelular pertencente ao grupo dos fungos ascomicetos. As células se dividem por brotamento logo após a duplicação do DNA, sendo que, em geral, o tempo de duplicação a 28-30 °C, tendo glicose como fonte de carbono, é de aproximadamente 90 minutos. Um asco típico de levedura possui quatro esporos. Através de remoção enzimática da parede celular dos ascos, os esporos podem ser separados por micromanipulação. Este procedimento permite a análise direta dos produtos da meiose, bem como a simples separação dos esporos para estudos individuais. Estes esporos isolados poderão se dividir mitoticamente e estabelecer uma linhagem haplóide. As linhagens haplóides podem apresentar duas marcas de cruzamento distintas: MATa ou MAT $\alpha$ . Quando células de "mating type" (marcas de cruzamento) diferente são colocadas em contato, pode haver o fusionamento destas, formando um zigoto diplóide, o qual irá se dividir por brotamento. Para certos estudos mutagênicos

é importante especificar a fase do ciclo celular as quais as células foram submetidas ao teste (MOUSTACCHI, 1980; ZIMMERMANN, 1984).

Em geral, as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são conhecidas como organismos fermentativos facultativos (metabolismo anaeróbico), possuindo também a capacidade de respirar (metabolismo aeróbico). Dependendo da disponibilidade de glicose, este microrganismo pode mudar seu metabolismo de fermentativo para oxidativo (respiração), sendo que a respiração é mais eficiente. A principal razão para a eficiência da respiração, é o fato de o etanol e outros produtos acumulados durante a fase fermentativa, poderem ser substrato para o metabolismo oxidativo (respiração). A energia obtida (ATP) tanto no processo fermentativo como no oxidativo é utilizada para suprir a energia requerida para o crescimento celular (FRAENKEL, 1982; GANCEDO & SERRANO, 1989; ENTIAN & BARNETT, 1992).

A fermentação da glicose e de outros substratos fermentáveis pode ocorrer mesmo em presença de oxigênio, é o chamado “efeito Crabtree” ou “fermentação aeróbica”. Portanto, a atividade respiratória das leveduras depende principalmente da concentração de glicose existente no meio de cultivo. Uma explicação para este fenômeno é o fato de que a síntese de algumas enzimas respiratórias são inibidas por glicose ou por seus catabólitos (repressão catabólica) (ENTIAN & BARNETT, 1992; WEUSTHUIS *et al.*, 1994; MORADAS-FERREIRA *et al.*, 1996).



Durante a fase inicial de crescimento, (crescimento logarítmico) a grande disponibilidade de glicose no meio de cultura causa a repressão catabólica, onde as células realizam o metabolismo anaeróbico, produzindo dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), etanol, glicerol e ácidos orgânicos. Durante a fase de transição ou diauxia, a concentração de glicose no meio de cultivo é reduzida pela metade, ocorrendo a desrepressão catabólica, e como consequência uma parada no crescimento celular. A partir deste momento metabólico (segunda fase de crescimento), as células realizam o metabolismo aeróbico, onde os produtos da fermentação armazenados na fase inicial do crescimento são agora oxidados até CO<sub>2</sub> e água (LAGUNAS, 1986; FRAENKEL, 1982; GANCEDO & SERRANO, 1989). A fase estacionária de crescimento ocorre somente após o etanol ser totalmente consumido (LEWIS *et al.*, 1993).

A repressão por glicose não ocorre apenas com enzimas respiratórias. Podemos verificar este mesmo efeito em enzimas antioxidantes e/ou envolvidas com algum tipo de stress. A superóxido dismutase dependente de manganês (SOD-Mn) é uma enzima codificada pelo DNA nuclear, também encontrada em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Durante a adaptação à fase respiratória, esta enzima é sintetizada e transportada para mitocôndria destas leveduras. Como a maioria das enzimas mitocondriais, a síntese de SOD-Mn é reprimida por concentrações elevadas de glicose (COSTA *et al.*, 1993). Outras enzimas envolvidas na defesa contra agentes oxidantes também tem sua síntese reprimida por glicose: catalases, glutathiona peroxidase e citocromo *c* peroxidase (KREMS *et al.*, 1995). A desrepressão dos genes correspondentes ocorre com a

adaptação respiratória, onde a glicose no meio de cultura está esgotada. A indução de defesas antioxidantes durante esta fase de adaptação pode ser considerada como uma prevenção ao estresse causado pela produção de ERO durante ao metabolismo aeróbico (MORADAS-FERREIRA *et al.*, 1996). Dentro deste contexto, foi recentemente descrito que a expressão do gene *UBI4*, que codifica a proteína poliubiquitina em *S. cerevisiae*, é bastante elevada em leveduras que estão em crescimento oxidativo, se comparada àquelas que estão em crescimento fermentativo. Provavelmente, este aumento na expressão do gene *UBI4*, venha contribuir para a proteção contra as ERO geradas durante a respiração (CHENG *et al.*, 1994).

#### 1.4.2.2.2. Testes de mutação reversa, “forward mutation”, conversão gênica e recombinação mitótica (crossing over) em *Saccharomyces cerevisiae*

A partir da década de quarenta, as leveduras têm sido largamente estudadas e, se tornando ferramentas importantes nas pesquisas sobre mutagênese. A descrição do ciclo de vida da levedura *Saccharomyces* e o conhecimento das características genéticas básicas, além da facilidade de manipulação, do baixo custo dos ensaios e, principalmente, do fato de este microrganismo ser eucarioto proporcionou a grande difusão deste sistema biológico como metodologia experimental para estudos de citotoxicidade e genotoxicidade de determinados compostos (ZIMMERMAN *et al.*, 1984). 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; RABELLO-GAY *et al.*, 1991)

Os experimentos de mutação reversa e “forward mutation” são os mais comumente utilizados por serem simples e de fácil avaliação. A mutação reversa refere-se à restauração da função de um gene previamente deletado que causa uma deficiência metabólica. Reversão de auxotrofia para prototrofia pode ser causada por uma substituição, inserção ou deleção de pares de bases, ou ainda mutação induzida no supressor do gene mutante original (MOUSTACCHI, 1980; ZIMMERMAN, 1984; ZIMMERMAN *et al.*, 1984; HENRIQUES *et al.*, 1987). A linhagem mais amplamente utilizada para a realização destes ensaios é a linhagem haplóide XV185-14c, descrita por VON BORSTEL e colaboradores (1971). Esta linhagem permite a detecção de mutações locus-específica, reversão do alelo ocre *lys1-1* e do alelo “missense” *his1-7*, além de reversões por alterações no quadro de leitura, locus *homo3-10*. A utilização de uma linhagem de levedura possuindo mais de um alelo mutante é bastante vantajosa, pois eventos mutacionais independentes podem ser estudados sob condições de tratamento absolutamente idênticas (ZIMMERMANN, 1984; ZIMMERMANN *et al.*, 1984).

Ao contrário da mutação reversa, a “forward mutation” ou mutação para frente é baseada em alterações genéticas que determinam a perda de uma função normal, como por exemplo a produção de um aminoácido. Geralmente a perda da função é recessiva no que se refere ao critério de crescimento na

ausência de um requerimento nutricional específico. A perda de atividade enzimática, levando à resistência a antibióticos, como por exemplo canavanina, é mais utilizada como procedimento de rotina. Os mutantes resistentes são analisados através de semeadura em meio seletivo contendo o antibiótico; somente as células mutantes crescerão (LEMONT, 1977; HENRIQUES *et al.*, 1987; RABELLO-GAY *et al.*, 1991).

O processo conhecido como recombinação caracteriza-se pela troca recíproca ou não recíproca de fragmentos do DNA entre cromátides irmãs ou cromossomas homólogos. Este fenômeno ocorre normalmente nas células diplóides, no início da meiose, visando justamente a troca de informação genética para aumentar a variabilidade gênica. No entanto, muitos agentes químicos e físicos podem interferir neste processo, aumentando sua frequência, independente da fase meiótica. Um aumento da frequência de recombinação em células diplóides é o reflexo dos mecanismos de reparação celular que são induzidos em resposta a danos causados ao DNA, por agentes químicos e físicos (ZIMMERMANN, 1984; ZIMMERMANN *et al.*, 1984). Podemos analisar dois tipos de recombinação nestes microrganismos: recombinação recíproca ou “crossing over” e conversão gênica.

No “crossing over”, ou permuta, ocorre a troca recíproca de segmentos de DNA entre cromátides homólogas. Em linhagens diplóides heterólogas, este processo pode ser detectado, caso seu genótipo apresentar um par de marcadores recessivos distantes entre si, mas localizados no mesmo braço

cromossômico em diferentes homólogos e frente aos alelos selvagens correspondentes. Para analisar o intercruzamento induzido por agentes se utiliza uma linhagem diplóide de levedura com um par de marcadores localizados em cromossomos homólogos. A ocorrência de “crossing over” entre dois marcadores resulta no posicionamento de ambos alelos recessivos no mesmo cromossomo homólogo, enquanto que os alelos selvagens localizam-se no outro cromossomo homólogo. As células diplóides portadoras de ambos alelos em homozigose seriam capazes de restaurar o genótipo original (ZIMMERMANN, 1984; ZIMMERMANN *et al.*, 1984; HENRIQUES *et al.*, 1987; RABELLO-GAY *et al.*, 1991).

A conversão gênica mitótica não produz recombinantes recíprocos e é caracterizada por uma transferência unilateral de pequenas partes do genoma, com cerca de 1000 nucleotídeos, entre regiões homólogas de cromátides não irmãs ou de cromossomos homólogos. Como na mutação reversa, este procedimento se baseia na restauração da auxotrofia para um dado requerimento nutricional. Neste caso, são utilizadas linhagens diplóides heterozigotas com dois alelos inativos diferentes no mesmo locus de um gene, necessário ao metabolismo de um dado fator de crescimento, e que serão dependentes da adição deste fator ao seu meio de cultivo. Entretanto, na conversão gênica ocorre a transferência de uma região intacta de um alelo mutante para substituir a seqüência nucleotídica deficiente de outro alelo, levando desta forma à restauração do genótipo selvagem, ou seja, a célula torna-se prototrófica para o fator em questão (ZIMMERMANN *et al.*, 1975;

ZIMMERMANN, 1984; ZIMMERMANN *et al.*, 1984; HENRIQUES *et al.*, 1987; RABELO-GAY *et al.*, 1991).

#### 1.4.2.3. Ensaio com células de mamíferos

Modelos animais têm desempenhado um importante papel neste contexto, mas nem sempre atingem os quesitos básicos para sua utilização imediata, como já citado anteriormente no item 1.4. Dentro deste contexto, a utilização de cultura de células de mamíferos para a avaliação toxicológica de químicos em geral, tem oferecido vantagens sobre o emprego de modelos animais destinados para os mesmos fins. Além dos testes serem de curta duração, trazendo benefícios econômicos e logísticos, são vantajosos também no sentido de se aproximarem metabolicamente aos seres humanos. Existem basicamente três requerimentos fundamentais para aplicação de testes em cultura de células de mamíferos. Em primeiro lugar, os ensaios devem ser reprodutíveis no que se refere a uma curva dose-resposta, em função da concentração do composto a ser testado. Em segundo lugar, o critério de avaliação da resposta deve ser linear em relação à concentração celular (WILSON, 1986).

O emprego de ensaios *in vitro* era destinado para “screening” de substâncias anticarcinogênicas. No princípio, os estudos eram principalmente qualitativos, onde a utilização de meios de cultura não definidos prejudicavam a análise quantitativa. Quando esta era realizada, baseava-se em quantificação

de alterações morfológicas causado às células. O desenvolvimento de meio de cultura semi-definido, juntamente com técnicas para crescimento celular em suspensão ou em monocamada permitiu o crescimento reprodutível de culturas, permitindo assim, demonstrar quantitativamente o efeito citotóxico de determinados compostos (WILSON, 1986).

#### **1.4.2.3.1. *Ensaio de Citotoxicidade e Proliferação Celular em Fibroblastos de Pulmão de Hamster Chinês - Células V79***

Dentre os vários efeitos que podem ser analisados em cultura de células de mamíferos, ensaios com células V79 foram empregados neste trabalho enfocando os efeitos da apomorfina no crescimento celular. O aumento na concentração celular em função do tempo de incubação pode ser definido como proliferação celular, que é reflexo de um comportamento normal da cultura. Este crescimento em cultura é medido através de incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina no DNA das células. Necessariamente, a diminuição desta incorporação não significa que a droga esteja provocando morte celular, pode estar apenas aumentando o tempo de duplicação das células, ou seja inibição de proliferação. Um aumento no tempo de duplicação é apenas indicador de citotoxicidade. Portanto, nestes ensaios, não há distinção entre diminuição da taxa de crescimento (proliferação celular) e morte celular (sobrevivência) (WILSON, 1986).

Experimentos não relacionados com proliferação celular em células V79, mas igualmente importantes, também são recomendados como protocolo para avaliação toxicológica de substâncias. Dentre estes ensaios destacam-se a análise de aberração cromossômica e troca entre cromátides irmãs, recomendados por SWIERENGA *et al.*, 1991.



## 2 - OBJETIVOS

Estudos realizados a partir da década de sessenta demonstraram que a apomorfina pode sofrer oxidação em presença de oxigênio molecular. Recentemente, tem sido mostrado que esta capacidade de autooxidação pode conferir a este alcalóide propriedades pro-oxidante bem como antioxidante. Além disso, o grande potencial farmacológico no tratamento do mal de Parkinson nos estimulou a esclarecer a correlação entre autooxidação da apomorfina e sua ação tóxica e genotóxica. O presente trabalho teve os seguintes objetivos:

1 - Determinar o mecanismo de oxidação *in vitro* da APO pelo uso de métodos de titulação potenciométrica e análise espectrofotométrica, estabelecendo desta forma, o potencial redox padrão ( $E^0$ ) da APO.

2 - Determinar o efeito mutagênico da APO solubilizada em diferentes tipos de solvente, pelo teste Salmonella/microsoma (Teste de Ames), utilizando as linhagens TA97, TA98 e TA102 de *Salmonella typhimurium* em presença e ausência de ativação metabólica.

3 - Determinar as atividades citotóxica e genotóxica (mutagênica e recombinogênica) da APO em culturas haplóides e diplóides de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* tratadas em diferentes fases de crescimento.

4 - Verificar a influência do metabolismo oxidativo e fermentativo nas respostas citotóxica e genotóxica de células diplóides leveduras tratadas com APO.

5 - Analisar o possível efeito protetor da glutathiona reduzida (GSH) sobre os efeitos citotóxicos e genotóxicos induzidos pela APO em células diplóides de leveduras.

6 - Investigar a citotoxicidade da apomorfina sobre fibroblastos de pulmão de Hamster Chinês (células V79), utilizando-se ensaios de proliferação celular.

7 - Analisar o envolvimento de metais de transição ( $\text{Fe}^{3+}$ ) no mecanismo de oxidação e ação tóxica da apomorfina, pelos métodos espectrofotométricos e ensaios de proliferação em células V79.

### **3 - CAPÍTULO 1**

**APOMOPHINE: CHEMICAL STUDIES AND MUTAGENIC  
RESPONSE IN THE SALMONELLA MUTAGENICITY ASSAY**

## **APOMOPHINE: CHEMICAL STUDIES AND MUTAGENIC RESPONSE IN THE SALMONELLA MUTAGENICITY ASSAY**

Ckless, K<sup>1</sup>.; Pasqual, M. S.<sup>2</sup>; Leygue-Alba, N. M. R<sup>3</sup>. and Henriques, J. A. P<sup>4</sup>.

1 - Centro de Biotecnologia. Departamento de Bioquímica - UFRGS; Porto Alegre - RS - Brasil.

2 - Departamento de Ciências Biomédicas - UCS - Caxias do Sul - RS - Brasil.

3 - Instituto de Biotecnologia - UCS - Caxias do Sul - RS - Brasil.

4 - Centro de Biotecnologia. Departamento de Biofísica - UFRGS; Porto Alegre - RS - Brasil.

Correspondence: Dr. J. A. P. Henriques

e-mail: [Pegas@dna.cbiot.ufrgs.br](mailto:Pegas@dna.cbiot.ufrgs.br)

Departamento de Biofísica

Centro de Biotecnologia, UFRGS

Av. Bento Gonçalves, 9500

Prédio 43421 - Campus do Vale

Caixa Postal 15005

91501-970 - Porto Alegre - RS - Brasil

## ABSTRACT

Apomorphine is a synthetic alkaloid derived from morphine. Due to structural similarity with dopamine it has been clinically used as an emetic agent, and also in the treatment of Parkinson's disease. APO autoxidizes under aerobic conditions. Previous work demonstrated that this compound acts either as antioxidant or pro-oxidant. Spectrophotometric studies showed that this alkaloid, when solubilized in pure water or in DMSO undergoes spectral changes in a time-dependent way. However, no significant changes were observed when 0.1 N HCl was used as solvent. The oxidation of APO generated mutagenic compounds to *Salmonella typhimurium* (Ames test). TA97 and TA98 strains demonstrated different sensitivity for mutagenic response to this drug, in absence of S9 mix. In the presence of S9 mix no mutagenic effect of oxidation products of APO was found. With strain TA102 apomorphine showed no mutagenic effect in any assays. The chemical studies *in vitro* demonstrated that during the autoxidation of APO a pair of electrons is involved, suggesting that the toxic and mutagenic effects of this alkaloid are not directly related to free oxygen radicals.

**Keywords:** Salmonella mutagenicity assay. Potentiometric titrations. APO. Auto-oxidation. Oxygen radicals.

## INTRODUCTION

Benzylisoquinoline alkaloids comprise a large group of secondary plant metabolites which display a variety of pharmacological activities. Some benzylisoquinoline alkaloids of synthetic origin have been used as therapeutic drugs. Apomorphine (APO) is a synthetic alkaloid obtained from morphine, through acid-catalyzed reaction (Fig. 1.3) (c. f. review NEUMEYER, 1981). For many years, it was only used for its emetic properties (RIOS *et al.*, 1989; SIMEÓN *et al.*, 1989). The great interest in this alkaloid is due to its structural similarity with dopamine, thus explaining the dopaminergic effects of APO (NEUMEYER *et al.*, 1981). For these reasons APO has been clinically used in the treatment of Parkinson's disease (GILMAN *et al.*, 1991; GANCHER, 1995).

In aqueous solutions, APO is unstable and undergoes decomposition in a time-dependent way. As other catechols, it is autoxidized under aerobic conditions (MASON, 1979; SAM *et al.*, 1994). The toxicity of some catechols and catecholamines in biological systems is probably due to the production of oxidized chemical species (KLEGERIS *et al.*, 1995). Some investigations have been done about deleterious effects provoked by APO in biological systems or *in vitro*. SUTTER & MATTER-JAEGER (1984) demonstrated the genotoxic effect of this alkaloid in bacteria. Its autoxidation produces mutagenic species that induce frameshift mutations in *Salmonella typhimurium* strains. Recently, MORELLO *et al.*, (1994) demonstrated trypanocidal effect of APO, and this effect could be correlated with its anti-oxidant activity. The mechanism of toxicity of this alkaloid is unclear. Many benzylisoquinoline alkaloids have got reactive phenolic groups which autoxidize themselves and can participate in redox reactions

(UBEDA *et al.*, 1993). It has been established that APO is oxidized by oxygen in neutral solution to the colored quinone derivative (SHAMA, 1972). This process leads to paradoxical activities: some previous works demonstrated that APO acts either as antioxidant or as prooxidant. UBEDA *et al.*, (1993) reported that APO increased deoxyribose degradation by a mechanism related to generation of superoxide anion radicals. However, this alkaloid was able to inhibit lipid peroxidation in microsomes.

In the present study we analyzed the chemical changes of APO, during its autoxidation process. We evaluated the mutagenic potential of this alkaloid in the Ames test and its possible relation to autoxidation mechanism.

## MATERIAL AND METHODS

### *Chemical products*

The benzyloquinoline alkaloid APO was obtained from E. Merck (Darmstadt, Germany). The potentiometric assays were done with oxidized and reduced solutions of this alkaloid. The oxidized solutions were prepared in distilled and deionized water and kept at 4 °C, during 3 weeks. To prepare reduced solution, 1 g of APO was resuspended in 3 ml of ethanol and recrystallized at room temperature. This process was repeated 3 times and after the alkaloid was resuspended in pure water obtained from Milli Q system. To carry out the Ames test, APO was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) or 0.1 N HCl

immediately prior to use. APO (1 mM) dissolved in DMSO, 0.1 N HCl and/or pure water were used to carry out spectrophotometric assays.

The titration solution (0.081 M sodium sulfite and 0.005 M potassium dichromate, 0.011) was prepared in pure water immediately prior to use.

### *Strains*

The *Salmonella typhimurium* strains TA97, TA98 and TA102, as described by MARON & AMES (1983), were kindly provided by B. M. Ames, University of California, Berkeley, CA (U.S.A.).

### *Spectrophotometric assay*

The APO solutions (1mM) were scanned in a Shimadzu UV-VIS spectrophotometer UV-160A at wavelengths between 200 and 800 nm. To carry out the spectral changes of APO in the presence of S9 mix cofactors, the same final concentration found in standard S9-mix of oxidized nicotinamide dinucleotide diphosphate (NADP), glucose-6-phosphate (G6P) and reduced glutathione (GSH) were used (MARON & AMES, 1983).

### *Titration and potentiometric assay*

Reduced solutions of APO were used in the potassium dichromate titration. The sodium sulfite titration was done with oxidized solution of APO. The oxidized and reduced stock solution of APO were diluted in pure water (v/v)



in the following way: (a) sodium sulfite titration: 0.037 M APO diluted 5:25; (b) potassium dichromate titration: 0.004 M APO diluted 5:20.

The redox potential measurements were done with Wheastone Bridge (DAMASKIN, 1981), modified. The measurements of null current intensity were done with micro-amperimeter, changing the voltage through a second variable resistance. The standard potential was considered the initial measurement before the addition of the titters (basic potential). The potential was measured with platine electrode, at 25 °C. Each test was repeated three times.

#### *Salmonella mutagenicity assay*

Mutagenicity was assayed by the preincubation procedure proposed by MARON & AMES (1983). Different concentrations of APO (20, 40, 60, and 80 µg/plate) were incubated with 100 µl of test bacterial cultures ( $1-2 \times 10^9$  cells/ml) in the presence or in the absence of metabolization during 20 min or 25 min, respectively, in the dark at 37 °C, without shaking. The S9 fraction, prepared from livers of Sprague-Dawley rats pretreated with polychlorinated biphenyl mixture (Aroclor 1254), it was purchased from Moltax (Annapolis, MD, U.S.A.). The S9 mix metabolic activation mixture was prepared according to MARON & AMES (1983). Two ml of soft agar (0.6% agar, 0.5% NaCl, 50 µM histidine, 50 µM biotin, pH 7.4, 45 °C) was added in the test tube. Immediately the mixture was poured onto a Petri dish with minimal agar (1.5% agar, Vogel-Bonner E medium, containing 2% glucose). In assays employing S9 fraction (16.3 mg/ml protein) 500 µl of S9 mix was added. The plates were incubated in

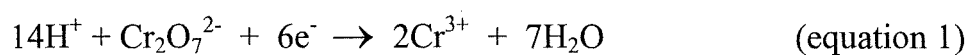
the dark at 37<sup>o</sup> C for 48 hours before counting the revertant colonies. All assays were done in triplicate. Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>, 0.5 µg/plate) was used as positive control for all strains in the metabolic activation assay. In the absence of S9 mix the positive control was 0.5 µg 4-nitroquinoline-oxide (4NQO) per plate. The negative controls (DMSO and/or 0.1N HCl) were used in all assays.

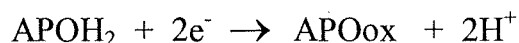
The final criterion used to interpret and consider the results of the Ames test as positive, was similar to that formerly used by VARGAS *et al.*, (1993; 1995), i. e. a number of revertants double that the spontaneous yields accompanied by a reproducible dose-response curve. The dose-response curves were evaluated by the SALMONEL software (MYERS *et al.*, 1991).

## RESULTS

### *Potentiometric titration*

Potentiometric assays were used to study the probable mechanism of APO oxidation *in vitro*. APO solutions were tittered by an oxidant or reducing agent and the redox potential was measured. Through values obtained during titration, it was possible to calculate the number of electrons that have changed between APO and oxidant/reducing agents (CHRISTIAN, 1994). With the values obtained in the potential measurements half-reaction was established (equation 1).





The APO standard potential ( $E^0$ ) was calculated based in titration dates.

$$E^0 = -0.286$$

### *Spectrophotometric assay*

Spectrophotometric assay showed a time-dependent decomposition when APO was solubilized in DMSO or pure water (Figure 2.3A and B). When APO was solubilized in pure water, the spectral changes (peaks at 415 and 620 nm) were observed at 24h after drug solubilization. The spectrum of APO dissolved in DMSO shows only a small peak at 620nm, and the peak at 415 nm was observed seven days after drug solubilization. However, when this alkaloid was solubilized in 0.1 N HCl no changes in the spectrum were observed (Figure 2.3C). In another set of experiments, the time-dependent APO decomposition in the presence of S9 mix cofactors was investigated. These results showed that decomposition of APO solubilized in pure water (control) start at 30 min after drug solubilization (Figure 3.3A). However, when NADP, G-6-P and GSH were added in the aqueous solution of APO, the decomposition of this drug was prevented (Figure 3.3B, C and D, respectively).

### *Salmonella mutagenicity assay*

Mutagenicity of APO was investigated in the Salmonella/microsoma assay. Figures 4.3 and 5.3 display the mutagenic activity of APO solubilized in DMSO or 0.1N HCl in *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA102 strains

with and without microsomal activation. With microsomal activation, no mutagenic effect was observed in this strain when APO was solubilized in 0.1 N HCl (Figure 4.3A). APO dissolved in DMSO showed a dose-response curve only in TA97 strain, but the mutagenesis index was not increased by a factor of two, therefore no positive response was detected. APO (DMSO) did also not induce any mutagenic response in TA98 and TA102 in the presence of metabolization (Figure 4.3B). The significant mutagenic effect of this alkaloid was only observed in the absence of metabolization. When 0.1 N HCl was used as solvent, TA97 showed a mutagenic response from lower dose of drug, however this effect did not increase when the drug concentration was increased. As was observed with microsomal activation, no mutagenic effect was detected in this solubilization conditions, on TA98 and TA102 (Figure 5.3A). A significant APO mutagenic effect was demonstrated on TA97, when this drug was solubilized in DMSO. In this same solubilization conditions TA98 showed a borderline mutagenic response and on TA102 APO was not able to induce mutagenic effect (Figure 5.3B).

## **DISCUSSION**

According to spectral changes, the APO oxidation was time-dependent. The spectral changes of this alkaloid solubilized in DMSO was observed in a later decomposition, when compared with this alkaloid solubilized in water (Fig. 2.3A and B). This result could be explained by the fact that there is less oxygen

dissolved in DMSO than in water, thus slowing down APO autoxidation. The difference in the time of decomposition between both solvent suggests that oxygen is responsible for starting decomposition of APO *in vitro* (ERHARDT, 1976). When this alkaloid was solubilized in pure water there was decomposition, due to air oxidation of catechol moiety (LINDE & RABAG, 1968). The spectral behavior of APO solubilized in 0.1 N HCl indicates that no decomposition occurred (Fig. 2.3C). As reported in other catecholamines, in low pH the dissociation of catechol moiety is more difficult, thus preventing its autoxidation (BERTINI, 1981.; KALYANARAMAN *et al.*, 1985). These results suggest that under acidic conditions the phenolic group of APO can not oxidize. This could explain the different mutagenic responses observed when the salmonella/microsoma assay was performed with APO solubilized in 0.1N HCl and DMSO (Figs 4.3A and 5.3A).

Nucleotide nicotinamide adenine diphosphate (NADP), glucose-6-phosphate (G6P) and reduced glutathione (GSH) prevents APO decomposition in comparison with the APO solubilized in pure water (Fig.3.3A, B, C and D). Since these cofactors are present in the S9 mix (MARON & AMES 1983), it suggests that they and/or other compounds, could be responsible for the observed non-mutagenic effects in salmonella mutagenicity assay performed with metabolism (Fig 4.3A and B). The protective mechanisms of these cofactors are not clear. It can be hypothesized that some of these compounds behave as reducing agents *in vitro* and in biological systems, thus decreasing the damages caused by APO.

The mutagenic response observed in TA97 and TA98 in the absence of S9 mix was probably due to the oxidized forms of APO (Fig. 5.3A and B). The different responses observed between these two strains could reflect a higher sensitivity of TA97. This strain has a second "hot spot" and, therefore, is more sensitive to some mutagens that also revert TA98 (MARON & AMES, 1983). This oxidized forms could be quinones or *o*- semiquinones, since these compounds can be formed either directly or indirectly from oxidation of the catechol moiety (MASON *et al.*, 1961; KALYANARAMAN, 1982; MONKS *et al.*, 1992). The potentiometric titration indicated that during APO oxidation this alkaloid gives and receives two electrons (equation 1), suggesting no semiquinone and oxygen reactive species generation *in vitro*. In addition, the determination of APO  $E^0$  suggests that this alkaloid has a reducing power, because substances that have negative  $E^0$  can give electrons spontaneously. This hypothesis corroborates with results obtained in the biological assays. TA102 showed no mutagenic effect in any Ames test conditions. This strain is especially designed to detect oxidative mutagens (LEVIN *et al.*, 1982). However, in biological systems semiquinones may be generated from oxidation/reduction of catechols and quinones by a variety of methods, including photooxidation, autoxidation/chemical oxidation and enzymic oxidation (KALYANARAMAN *et al.*, 1985; CADENAS & ERSNTER, 1990; MONKS *et al.*, 1992). Quinones and semiquinones are reactive molecules that can bind to proteins, enzymes or other endogenous constituents producing conjugates, DNA adducts and secondary free radical (KALYANARAMAN *et al.*, 1985.; MONKS *et al.*, 1992). Semiquinone radical can react both as nucleophiles, as spontaneously with

molecular oxygen to regenerate the quinone and to form superoxide radical (THOR *et al.*, 1982; WEFERS & SIES, 1983; SMITH *et al.*, 1985). Besides that, quinones are potent electrophiles subject to attack by nucleophiles such as the thiol group of reduced glutathione, which is abundant in many cells. Depletion of reduced glutathione can result in DNA damage and other consequences (THOR *et al.*, 1982; DI MONTE *et al.*, 1984).

It is clear that further investigations related with electrochemical and steric properties of APO are necessary. Besides that, a potentiometric study of APO could supply further data in order to obtain a better explanation of the toxicity mechanism *in vivo*.

*Acknowledgments:* We thank Mirian Benício da Fonseca for helpful in the experimental work. This work was supported by grants from Brazilian Agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and laboratório de Genotoxicidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Genotox).



## REFERENCES

- BERTINI, I.; LUNAZZI, L. & DEI, A. (1981) *Advances in Solution Chemistry*. Plenum Press, New York, 387p.
- CADENAS, E. & ERNSTER, L. (1990) Quinoids compounds: high-performance liquid chromatography with eletrochemical detection *Met. Enzimol.*, **186**:180-196.
- CHRISTIAN, D.G. (1994). *Analytical Chemistry*. New York, John Wiley & Sons. 812p.
- DAMASKIN, B.B. & PETRI, O.A. (1981) *Fundamentos de la Electroquímica Teórica*. Mir, Moscú. 230p.
- DI MONTE, D.; ROSS, D.; BELLOMO, G.; EKLOW, L. & ORRENIUS, S. (1984) Alteration in intracellular thiol homeostasis during the metabolism of menadione by isolate rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**:334-342.
- ERHARDT, P.W.; SMITH, R.V.; SAYTHER, T. & KEISER, J.E. (1976) Thin-layer chromatography of apomorphine and its analogs. *J.Chrom.*, **116**:218-224.
- GANCHER, S.T. (1995) Dopamine agonists under investigation including apomorphine. In: KOLLER, W.C. & PAULSON, G. (eds) *Therapy of Parkinsons disease*. 2ed. Marcel Decker, inc. New York. p.273-286.
- GILMANN, A. G.; RALL T.W.; NIES, A.S. & TAYLOR, P. (1991). *As Bases Farmacológicas da Terapeutica*. 8 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1232p.
- KALYANARAMAN, B.; FELIX, C.C. & SEALY, R.C. (1985) Semiquinone anion radicals of catechol(amine)s, catechol estrogens and their metal ion complexes. *Environ. Health Persp.*, **64**:185-198.
- KALYANARAMAN, B. & SEALY, R.C. (1982) Electron spin ressonance-spin stabilization in enzymatic systems: detection of semiquinones produced during peroxidatic oxidation of catechols and catecholaminas. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **106**:1119-1125.
- KLEGERIS, A.; KORKINA, L.G. & GREENFIELD, S.A. (1995) Autoxidation of dopamine: a comparison of luminescent and spectrophotometric detection in basic solutions. *Free Rad. Biol. Med.* **18**:215-222.
- LINDE, H.H.A. & RABAG, M.S. (1968) Die autoxydation des aporphins. *Helvetica Chim. Acta*, **51**:683-687.

- MARON, D.M. & AMES, B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mut. Res.*, **113**:173-215.
- MASON, R.P. (1979) Free radical metabolites of foreign compounds and their toxicological significance. In: HODGSON, E.; BEND, J.R. & PHILPOT, R.M. (eds), *Rev. Biochem. Toxicol.* pp 151-200.
- MASON, R.P.; SPENCER, E. & YAMAZAKI, I. (1961) Identification by electron spin resonance spectroscopy of the primary product of tyrosinase-catalyzed catechol oxidation. *Biochem. Biophys. Acta*, **582**:537-542.
- MONKS, T.J.; HANZLINK, R.; COHEN, G.M.; ROSS, D. & GRAHAM, D. (1992) Contemporary issues in toxicology. Quinone chemistry and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **112**:2-16.
- MORELLO, A.; LIPCHENCA, I.; CASSELS B.K.; SPIESKY, H.; ADUNATE, J. & REPETTO, Y. (1994) Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **107C**:367-371.
- MYERS, L.; ADAMS, N.; KIER, L.; RAO, T.K.; SHAW, B. & WILLIAMS, L. (1991) Microcomputer software for data management and statistical analysis of the Ames/Salmonella test. In: KREWSKI, D. (ed) *Statistical Methods in Toxicological Research*. Gordon and Brech, New York. pp265-279.
- NEUMEYER, J.L.; LAL, S. & BALDESSARINI, R.J. (1981) Historical highlights of the chemistry, pharmacology and early clinical uses of apomorphine. In: GESSA, G.L. & CORSINI, G.U. (eds), *Apomorphine and other Dopamimetics*, vol 1, Basic Pharmacology, Raven Press, New York, pp 1-17.
- RÍOS, J.L.; SIMEÓN, S. & VILAR, A. (1989) Pharmacological activity of aporphinoid alkaloids. A review. *Fitoterapia*, **60**: 311-317.
- SAM, E.; AUGUSTIJNS, P. & VERBEKE, N. (1994) Stability of apomorphine in plasma and its determination by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chrom. B*, **658**:311-317.
- SHAMA, M. (1972) The aporphines. In: *The Isoquinolines Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*. Academic Press, New York and London, pp 194-228.
- SIMEÓN, S.; RÍOS, J.L. & VILLAR, A. (1989) Pharmacological activities of protoberberines alkaloids. *Planta Med. Phytoter.*, **XXIII**, 202-250.
- SUTER, W & MATTER-JAEGGER, I. (1984) Genotoxicity of apomorphine and various catecholamines in the *Salmonella* mutagenicity (Ames test) and in tests for primary DNA damage using repair-deficient *B. subtilis* strains (Rec assay). *Mut. Res.*, **137**:17-28.

- SMITH, M.T.; EVANS, C.G.; THOR, H. & ORRENIUS, S. (1985) In: SIES, H. *Oxidative stress*. London, Academic Press, pp 91-113.
- THOR, H.; MIRABELLI, F.; SALIS, COHEN, G.M.; BELOMO, G. & ORRENIUS, S. (1982) Alterations in hepatocyte cytoskeleton caused by redox cycling and alkylating quinone. *Arch. Biochem. Biophys.*, **226**:397-407.
- UBEDA, A.; MONTESINOS, C. PAYÁ, M. & ALCARAZ, M.J. (1993) Iron-reducing and free radical scavenging properties of apomorphine and some related benzylisoquinolines. *Free Radicals in Biology and Medicine*, **15**:159-167.
- VARGAS, V.M.F.; GUIDOBONO, R.R.; JORDÃO, C. & HENRIQUES, J.A.P. (1993) Use of two short term tests to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration/extraction procedures. *Mut. Res.*, **319**:31-45.
- VARGAS, V.M.F.; MOTTA, V.E.P. & HENRIQUES, J.A.P. (1995). Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mut. Res.*, **298**:261-267.
- WEFERS, H & SIES, H. (1983) Hepatic low-level chemiluminescence during redox cycling of menadione and the menedione-glutathion4 conjugate: relation to glutathione and NAD(P)H quinone reductase (DT-diaphorase). *Arch. Biochem. Biophys.* **224**:568-578.

## LEGENDS OF FIGURES

Figure 1.3. Obtention of apomorphine from morphine, through acid-catalyzed reaction.

Figure 2.3. Time-dependent APO (1mM) decomposition analyzed at zero time (gray line), after 24hr (dotted gray line) and after seven days (black line) of solubilization .A. APO solubilized in pure water; B. APO solubilized in DMSO; C. APO solubilized in 0.1N HCl.

Figure 3.3. Time-dependent APO (1mM) decomposition in the presence of S9 mix cofactors analyzed at zero time (gray line), after 30 min. (dotted gray line) and after 1h (black line) of solubilization. A. APO solubilized in pure water; B. APO solubilized in pure water plus NADP; C. APO solubilized in pure water plus G6P; D. APO solubilized in pure water plus GSH. The concentrations used in this assay are the same used in standard S9 mix as described in MARON & AMES (1983).

Figure 4.3. Induction of HIS<sup>+</sup> revertants in *Salmonella typhimurium* TA97, TA98 and TA102 by APO in the presence of metabolization (S9 mix). A. APO solubilized in 0.1N HCl; B. APO solubilized in DMSO. Mutagenesis Index corresponds to number of HIS<sup>+</sup> induced by APO/ number of spontaneous HIS<sup>+</sup> in the negative control (solvent). \* significant at 5%; \*\* significant at 1%

Figure 5.3. Induction of HIS<sup>+</sup> revertants in *Salmonella typhimurium* TA97, TA98 and TA102 by APO in the absence of metabolization (S9 mix). A. APO solubilized in 0.1N HCl; B. APO solubilized in DMSO. Mutagenesis Index corresponds to number of HIS<sup>+</sup> induced by APO/ number of spontaneous HIS<sup>+</sup> in the negative control (solvent). \* significant at 5%; \*\* significant at 1%

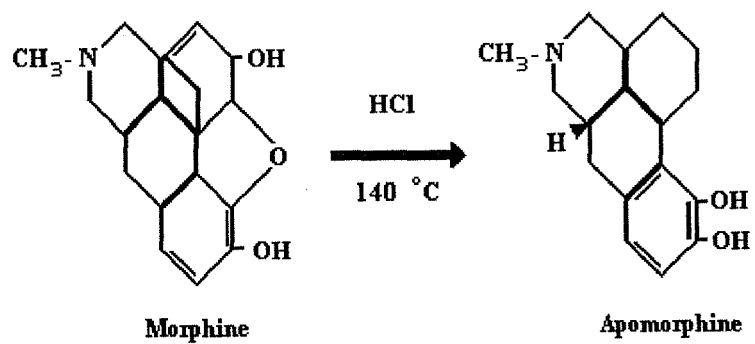


Figure 1.3. Obtention of apomorphine from morphine, through acid-catalyzed reaction.

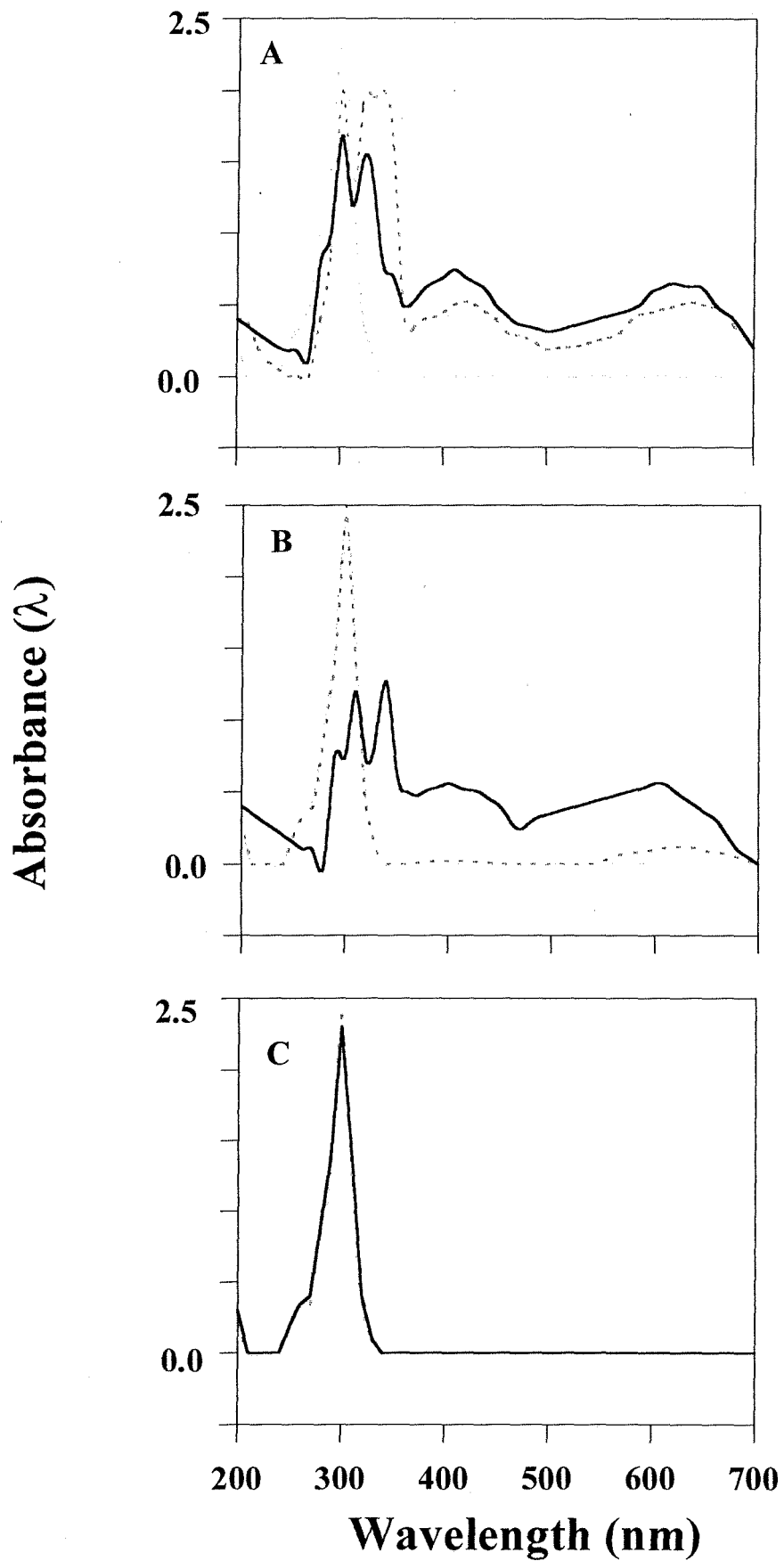


Figure 2.3. Time-dependent APO (1mM) decomposition analyzed at zero time (gray line), after 24hr (dotted gray line) and after seven days (black line) of solubilization .A. APO solubilized in pure water; B. APO solubilized in DMSO; C. APO solubilized in 0.1N HCl.

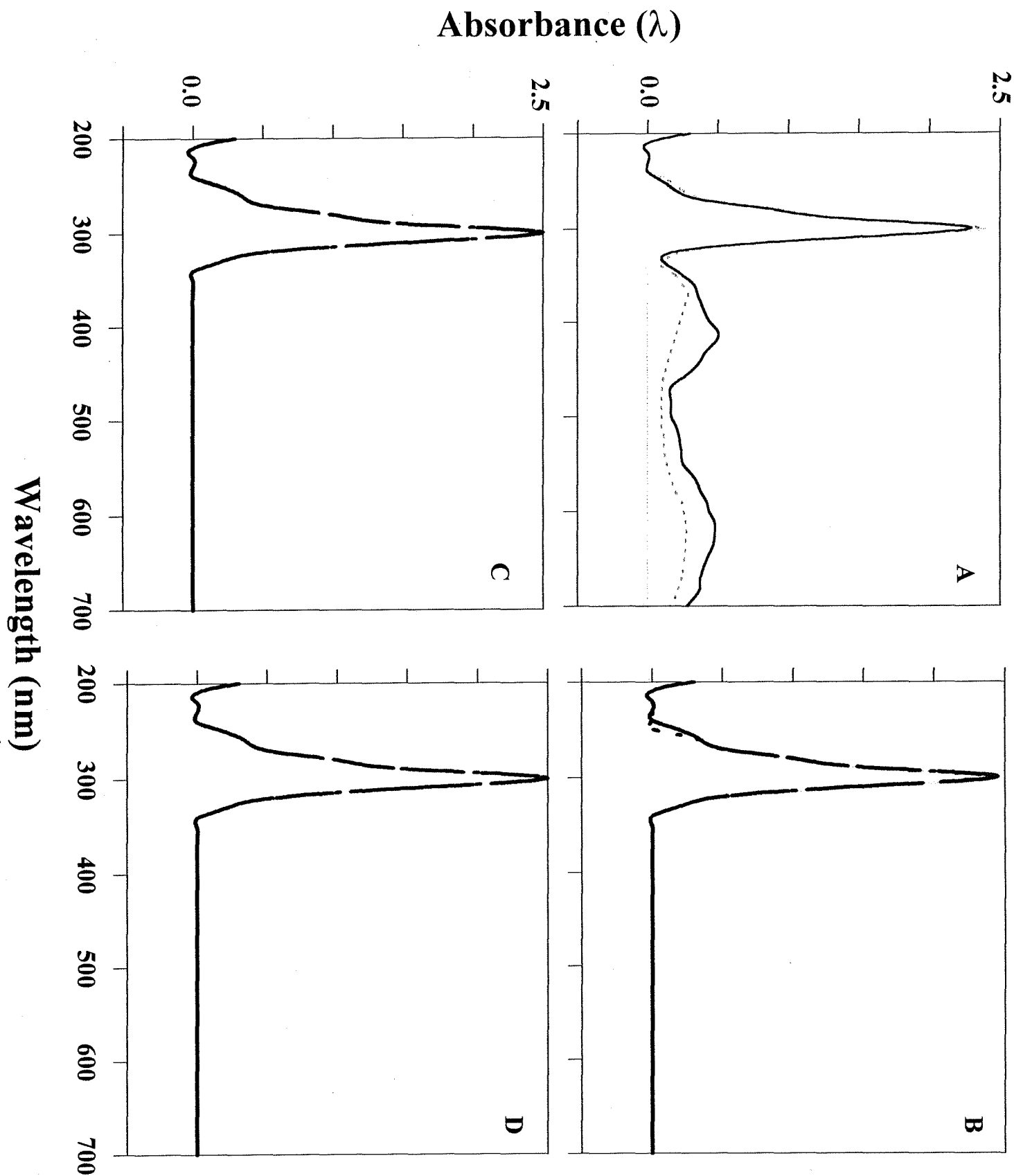


Figure 3.3. Time-dependent APO (1mM) decomposition in the presence of S9 mix cofactors analyzed at zero time (gray line), after 30 min. (dotted gray line) and after 1h (black line) of solubilization. A. APO solubilized in pure water; B. APO solubilized in pure water plus NADP; C. APO solubilized in pure water plus G6P; D. APO solubilized in pure water plus GSH. The concentrations used in this assay are the same used in standard S9 mix as described in MARON & AMES (1983).

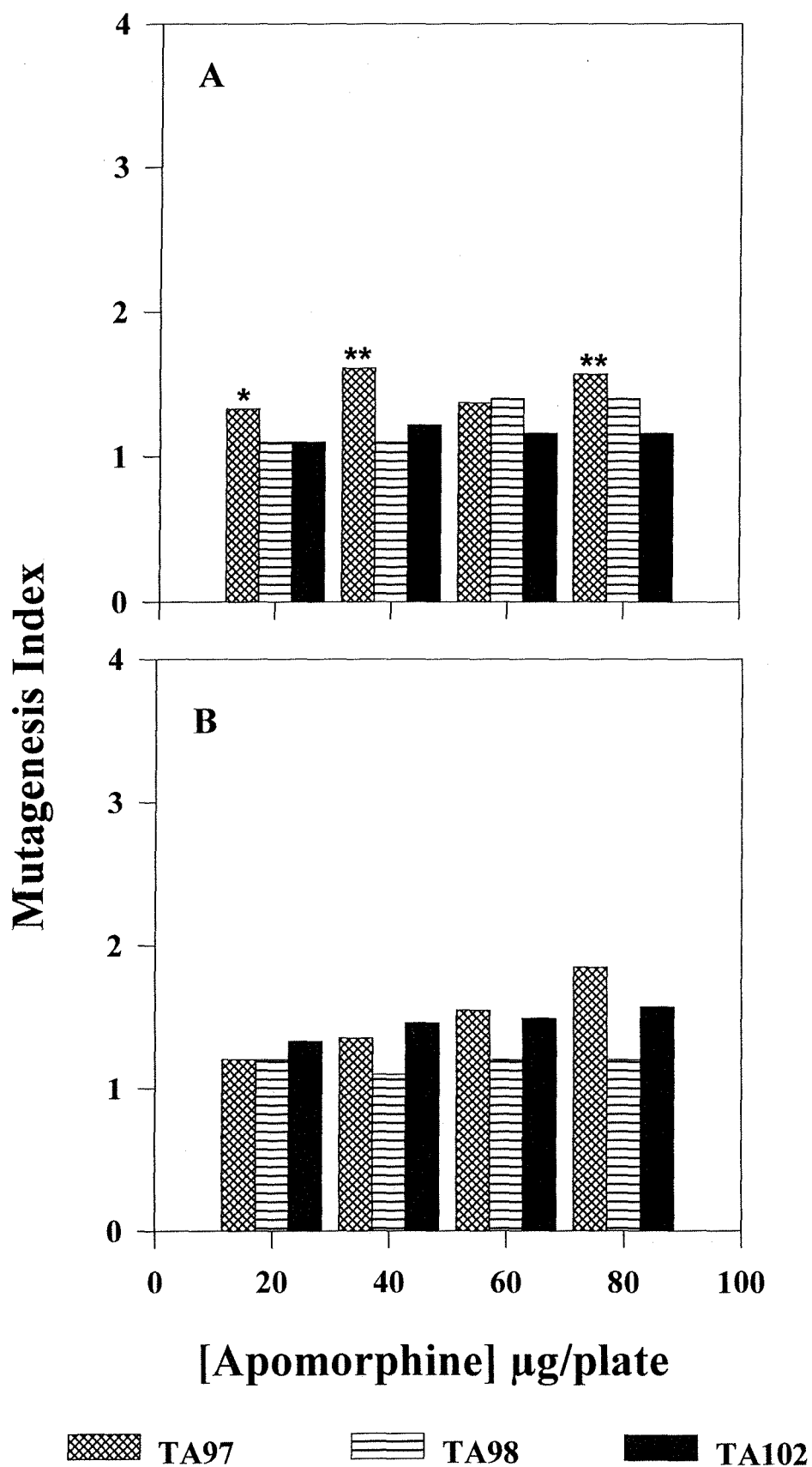


Figure 4.3. Induction of  $\text{HIS}^+$  revertants in *Salmonella typhimurium* TA97, TA98 and TA102 by APO in the presence of metabolism (S9 mix). A. APO solubilized in 0.1N HCl; B. APO solubilized in DMSO. Mutagenesis Index corresponds to number of  $\text{HIS}^+$  induced by APO/ number of spontaneous  $\text{HIS}^+$  in the negative control (solvent). \* significant at 5%; \*\* significant at 1%



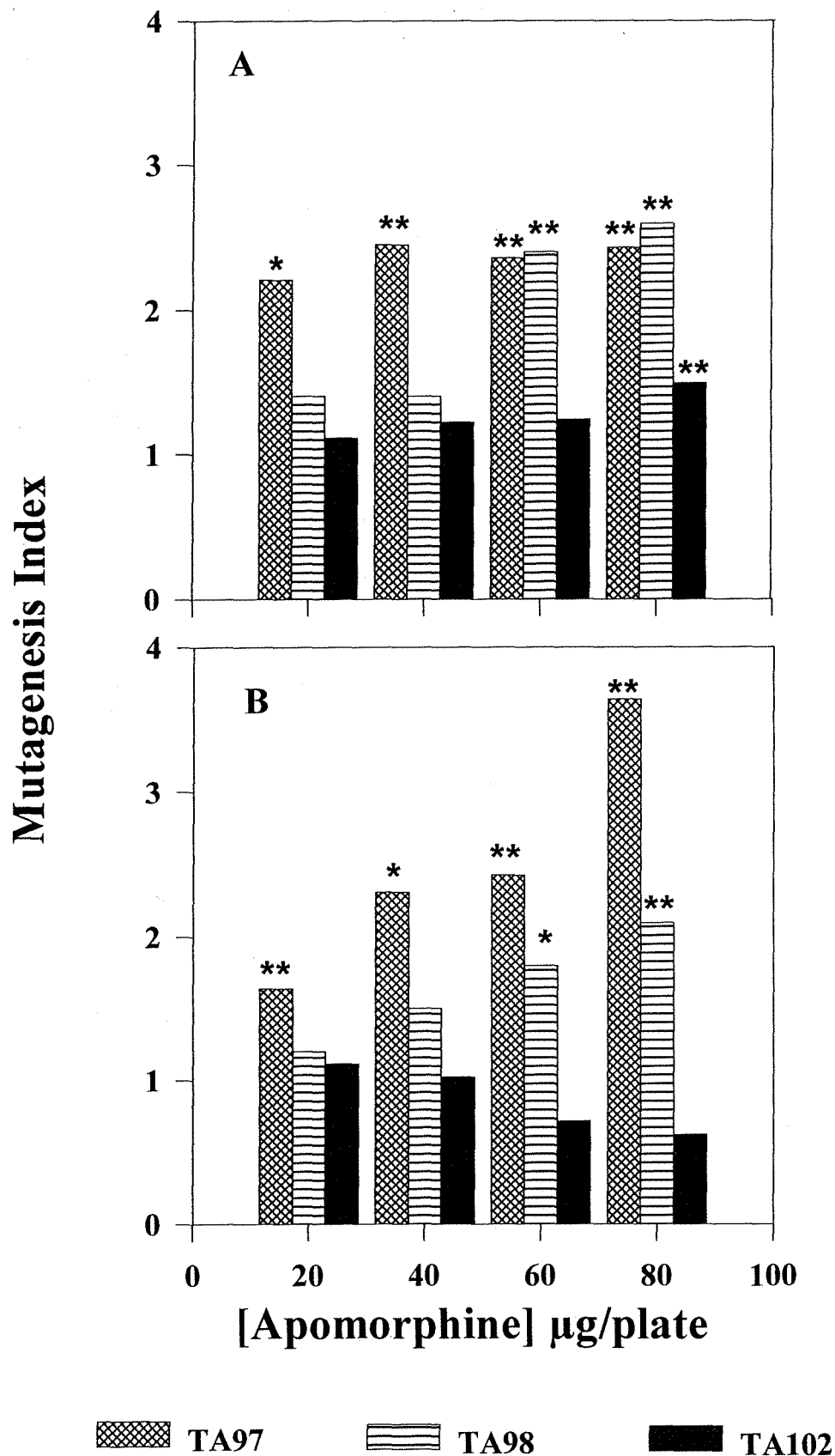


Figure 5.3. Induction of  $HIS^+$  revertants in *Salmonella typhimurium* TA97, TA98 and TA102 by APO in the absence of metabolism (S9 mix). A. APO solubilized in 0.1N HCl; B. APO solubilized in DMSO. Mutagenesis Index corresponds to number of  $HIS^+$  induced by APO/ number of spontaneous  $HIS^+$  in the negative control (solvent). \* significant at 5%; \*\* significant at 1%

## 4 - CAPÍTULO 2

**CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF APOMORPHINE  
ON *Saccharomyces cerevisiae* STRAINS: INVOLVEMENT OF  
FERMENTATIVE AND OXIDATIVE METABOLISM**

**CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF APOMORPHINE  
ON *Saccharomyces cerevisiae* STRAINS: INVOLVEMENT OF  
FERMENTATIVE AND OXIDATIVE METABOLISM**

Ckless, K.<sup>1</sup>; Pasqual, M.S.<sup>2</sup> and Henriques, J.A.P.<sup>3</sup>

1 -Centro de Biotecnologia, Depto. de Bioquímica, UFRGS; Porto Alegre - RS -Brasil.

2- Departamento de Ciências Biomédicas, UCS; Caxias do Sul - RS - Brasil.

3- Centro de Biotecnologia, Depto de Biofísica, UFRGS; Porto Alegre - RS - Brasil.

**Correspondence:** Dr. J.A.P. Henriques

e-mail: [Pegas@dna.cbiot.ufrgs.br](mailto:Pegas@dna.cbiot.ufrgs.br)

Centro de Biotecnologia

Av. Bento Gonçalves, 9500

Prédio 43421 - Campus do Vale

Caixa Postal 15005

91501-970 - Porto Alegre - RS - Brasil

## ABSTRACT

Apomorphine is a synthetic benzilisoquinoline alkaloid obtained from morphine. This alkaloid presents similarity with dopamine due to catechol moiety. The cytotoxic effects of catechols and catecholamines are oxidation-dependent and its process is linked with oxidative metabolism. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is an eukaryotic microorganism presenting both a fermentative as well as an oxidative metabolism. In this work, it was showed that apomorphine was able to induce important cytotoxic effect on haploid and diploid yeast cell cultures. This effect was dependent of ploidy status, growth phase, and drug autoxidation. This alkaloid was able to induce significantly frameshift mutation and crossing over in exponentially growing phase of haploid and diploid cells, respectively. Reduced glutathione was able to abolish the cytotoxic and genotoxic effects caused by this alkaloid. The protective effect of reduced glutathione was more pronounced in early exponential phase of growth.

**Keywords:** Apomorphine. Cytotoxicity and genotoxicity. *Saccharomyces cerevisiae*. Oxidative and fermentative metabolism.

## INTRODUCTION

Apomorphine (APO) is a synthetic benzilisoquinoline alkaloid obtained through acid-catalyzed reaction from morphine (SHAMA, 1972). This drug is known since 1869, and it has been used as emetic agent (NEUMEYER *et al.*, 1981; RIOS *et al.*, 1989; SIMEÓN *et al.*, 1989). Nowadays, APO has been receiving renewed attention due to its anti-Parkinson therapeutic properties (GANCHER, 1995). Such effect is caused by structural similarity to dopamine (SHAMA, 1972; NEUMEYER, 1985).

This alkaloid shows in its structure a catechol moiety. In a biological system, the catechol oxidation can produce quinone and semiquinone radicals by oxidative metabolism, involving several enzymatic systems (KAPPUS & SIES, 1981; WARDMAN *et al.*, 1995). The oxidation of APO catechol moiety is pH-dependent (SHAMA, 1972; SAM *et al.*, 1994) resulting in a deep color product (MASON, 1979), as well as, *o*-semiquinone, quinone derivatives and oxygen free radicals (COHEN & HEKKILA, 1974; SULLIVAN & STERN, 1981). These reactive compounds are toxic by covalent binding to proteins, enzymes and other endogenous constituents (WICK & FITZGERALD, 1981; MONKS *et al.*, 1992). The APO autoxidation has been correlated with some activities verified *in vitro* and *in vivo*. APO has shown to be able to induce frameshift mutations in *Salmonella typhimurium* in the Ames test and its mutagenic action was attributed to products of its autoxidation (SUTER & MATTER-JAEGER, 1984). It

has been recently shown that APO increased deoxyribose degradation and stimulated DNA damage production by  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  (UBEDA *et al.*, 1993). In contrast, APO showed antioxidant properties. Recent studies showed that APO inhibited lipid peroxidation induced by  $\text{Fe}^{3+}$  (MARTINEZ *et al.*, 1992; UBEDA *et al.*, 1993;). Furthermore, recent data on the tripanocidal effects of aporphine alkaloids, distinguished APO as the most toxic drug to *Trypanosoma cruzi*, suggesting its potential application as an antitripanosomal drug in the treatment of Chagas disease (MORELLO *et al.*, 1994).

The cytotoxic effect of catechols and catecholamines is dependent of oxidation and this process is linked with oxidative metabolism (KALYANARAMAN *et al.*, 1985). *Saccharomyces cerevisiae* is an eukaryotic microorganism that has been used as experimental model in biochemistry and genetics. This yeast is able to change from fermentative to oxidative metabolism, depending on the kind and concentration of carbon sources (LAGUNAS, 1986; WEUSTHUIS *et al.*, 1994).

The aim of this study was to analyze the cytotoxic and genotoxic effects of apomorphine on *Saccharomyces cerevisiae* strains and correlate these effects with oxidoreductive metabolism of yeast.

## MATERIAL AND METHODS

### *Strains*

The haploid *Saccharomyces cerevisiae* XV-184-14c strain (Mat  $\alpha$  *ade2-1*, *arg4-17*, *his1-7*, *lys1-1*, *trp5-48*, *hom3-10*) was constructed by VON BORSTEL (1971).

The diploid *S. cerevisiae* XS2316 strain was described by MACHIDA & NAKAI (1980), possessing the following genotype:

$$\frac{+}{ade6} \circ \frac{leu1-1}{leu1-12} \frac{trp5-48}{+} \frac{+}{cyh2} \frac{+}{met13} \frac{+}{lys5-1} \frac{MAT\alpha}{MAT\alpha} \frac{his1-1}{his1-1}$$

### *Chemicals*

Apomorphine chloride was obtained from E. Merck (Darmstadt, Germany). To carry out the experiments, the alkaloid was solubilized in pure water from Milli Q system. Stock solution (10 mg/ml) was prepared prior to use. The appropriate solutions of drug were obtained by dilution of stock solution in pure water from Milli Q system. To carry out the assays with glutathione, reduced glutathione (Sigma), was solubilized in pure water at concentration of 2 mg/ml, also prior to use.

### *Media*

YEPD medium containing 0.5% yeast extract (Difco), 2% bacto-peptone (Difco) and 2% dextrose (Difco) in pure water. For plating it was solidified with 2% bacto-agar (Difco). The minimal medium (MM) contained 2% dextrose and 0.67% bacto-yeast nitrogen base without amino acids (Difco) and 2% bacto-agar (Difco). The synthetic medium (SC) contained 2 mg adenine, 2 mg arginine, 5 mg lysine, 1 mg lysine, 2 mg leucine, 2 mg methionine, 2 mg tryptophan, 24 mg threonine per 100 ml MM. The omission media lacking lysine, histidine or homoserine (SC-lys, SC-his, or SC-homo) were used to determine mutagenesis on XV185-14c strain. In order to verify recombinogenesis, leucine was omitted from synthetic medium (SC-leu), also can be verified by adding 200  $\mu$ g of cycloheximide (Calbiochem, USA) at YEPD medium.

#### *Growth yeast conditions*

Stationary-phase cultures were obtained by inoculating  $5 \times 10^6$  cells/ml of a liquid YEPD culture in stationary phase in 5 ml of YEPD medium. After 72h of incubation at 30 °C with aeration by shaking, the cultures contained  $2 \times 10^8$  cells/ml. Mid-exponential phase cultures were obtained by inoculation of  $5 \times 10^5$  cells/ml of the same YEPD stationary culture in 150 ml of YEPD liquid medium. After 12h of incubation under the same conditions, the cultures contained  $2 \times 10^7$  cell/ml and 20-40% budding cells. The early-exponential phase was obtained by inoculating  $5 \times 10^3$  cells/ml in 150 ml of YEPD liquid medium. After 12h of incubation at the same conditions, the cell suspension



contained  $6 \times 10^6$  cells/ml. The cell number and proportion of budding cells were determined by counting in hemocytometer, as previously described (PASQUAL *et al.*, 1993).

#### *Survival and Mutagenesis Assays*

A cell suspension ( $2 \times 10^8$  cells/ml) in mid-exponential or stationary growth phase was incubated in 3 ml of phosphate-buffer (0.2 M, pH 7.0) in the presence of different apomorphine concentrations, during 6h at 28 °C with aeration by shaking. After appropriated dilution, treated and untreated cells were seed in YEPD medium, to determine the survival, and the counting of survivors colonies was performed after 3 days of incubation at 28 °C. Scoring of HIS, LYS and HOM prototrophic colonies on appropriate omission media was performed after 7-10 days. The *lys1-1* allele is a suppressible *ochre* nonsense mutant (HAWTHORNE, 1969), which can be reverted either by a reversion at *lys1-1* locus itself or by a forward mutation at one the eighth suppressor gene loci (HAWTHORNE and MORTIMER, 1963; VON BORSTEL *et al.*, 1971). Distinctions between reversions at the *lys1-1* allele itself and forward mutations at the suppressor was made by method described by SCHULLER and VON BORSTEL (1974). The *his1-7* is a missense allele which is non-suppressible, and reversion result from mutations at the locus itself (SNOW, 1978). The *hom-3-10* is belived to be a frameshift defect due to its response to a range of diagnostic mutagenes (VON BORSTEL *et al.*, 1971).

### *Detection of Induced Recombination*

After the same conditions of treatment described above, the cells were diluted and plated on YEPD for analysis of cell survival, SC-Leu for intragenic recombination (gene conversion) in the *leu2* locus and YEPD+Cyh for intergenic recombination (crossing over) in the *cyh2* locus. To verify the involvement of glutathione in the cytotoxic and genotoxic effects of apomorphine, 100 µg/ml of reduced glutathione was added in the cultures during the treatment. Plates were incubated for 4-5 days at 28 °C and colonies were scored. For detecting commitment haploidization it was used the procedure described by MACHIDA & NAKAI (1980). The colonies in the omission media were classified as true recombinant according to POTHIN *et al.*(1994).

## **RESULTS**

### *Cytotoxic Effect*

The Table 1.4 and 2.4 show the cytotoxic response of APO *S. cerevisiae* cells treated in early-, mid-exponential and stationary cultures of yeast haploid and diploid cells. The cells in early- and mid-exponential phase were more sensitivite to the lethal effects of this alkaloid than cells treated in stationary phase of growth. This phase-dependent effect is more pronounced in haploid cells than diploid cells (Table 1.4 and 2.4).

### *Mutagenic effect*

The Table 1.4 shows the frequencies of both points ( $HIS1^+$ ,  $LYS1^+$ ) and frameshift ( $HOM3^+$ ) mutations induced by APO in stationary and mid-exponential cultures of haploid yeast cells. It is clearly seen that non toxic APO doses applied did not induced mutations. As observed to APO cytotoxic effects, the cultures treated in mid-exponential phase were more sensitive to mutagenic effect caused by APO than in stationary growth phase. It was observed that this alkaloid was able to induce frameshift mutation (*Hom3-10*) from 50  $\mu\text{g/ml}$  in mid-exponential phase of growth. However, significant point mutation in this phase (*lys1-1*) was observed mainly at 75 $\mu\text{g/ml}$ , therefore upon this concentration the revertant was not observed because the survivors number was very low. In stationary phase of growth the induction of frameshift mutation was only significant at higher APO concentration, indicating a borderline effect. No induction of point mutation (*lys1-1* and *his1-7*) was observed in this phase. (Table 1.4).

### *Recombinogenic effect*

The search for recombinogenic effect of APO was carried out in stationary, mid- and early-exponential cultures of yeast diploid cells. The Table 2.4 shows the recombinogenic effect of APO on diploid *S. cerevisiae* strain XS2316. APO induced significant (Student t-test) crossing over from de 50 $\mu\text{g/ml}$  in mid-exponential phase of growth. In the early-exponential phase, the

induction of crossing-over was significant at 60  $\mu\text{g/ml}$  and at higher dose (100  $\mu\text{g/ml}$ ) of APO, the crossing over number falls due to the strong cytotoxic effect of this drug. In stationary phase of growth an increase dose-dependent in the crossing-over number was observed, however only in the higher concentration of this alkaloid this effect was significant (Table 2.4). However, it can be seen in Table 2.4 that at the non toxic APO applied dose the frequency of crossing over was close to spontaneous rate. This occurs for both growth phases. Therefore, even in toxic doses, APO was not able to increase the frequency of gene conversion, on all growth phases tested (Table 2.4).

#### *Involvement of glutathione on cytotoxic and genotoxic effects of APO*

In another set of experiments the protective effect of glutathione was observed against damages caused by APO on *S. cerevisiae* diploid cells treated either early-exponential and mid-exponential phase of growth. Table 3.4 shows the protective effect of glutathione on the APO cytotoxicity and genotoxicity. When the treatment was performed in the presence of glutathione (100  $\mu\text{g/ml}$ ), no significant APO cytotoxic and genotoxic effects were observed in mid-exponential phase of growth, indicating a total protection in this phase of growth (Figure 1.4) However, when cells in early-exponential phase of growth were treated with APO in presence of glutathione, the protective effect was not total, but at highest dose, the survival increased about three logs, when compared with treatment performed without GSH. (Figure 1.4).

## DISCUSSION

The cytotoxic and genotoxic effects of APO on *Saccharomyces cerevisiae* cultures depend upon alkaloid concentration as well as growth phase and ploidy of the yeast strain. This alkaloid undergoes autoxidation (MASON, 1979) producing oxygen reactive species, *o*-semiquinones and quinones (COHEN & HEKKILA, 1974; SULLIVAN & STERN, 1981). These reactive products can interact with proteins, enzymes, nucleic acids and other endogenous constituents, thus causing cell damage (MONKS *et al.*, 1992). The results indicate that cytotoxicity and genotoxicity observed by APO is dependent mainly of autoxidation reactive products.

Both haploid and diploid strains were more sensitive to deleterious effects of APO in mid- and/or early exponential phase, respectively (Table 1.4 and 2.4). This dependence can be associate to differences in metabolism and cellular defense mechanisms. During growth in fresh medium containing glucose, the cells are in the logarithmic initial phase. In this phase, the glucose is abundant in the medium, and an anaerobic metabolism takes place. As it is known, the glucose exerts a repressive effect on the synthesis of a variety of enzymes (catabolic repression) (GANCEDO & SERRANO, 1989; GANCEDO, 1992). Thus, many defense enzymatic can be repressed by glucose, including

catalases, superoxide dismutases, glutathione peroxidase and cytochrome c peroxidase. Derepression of the corresponding genes occurs along with the respiratory adaptation that follows glucose exhaustion (MORADAS-FERREIRA *et al.*, 1996). The catabolic repression could be one explanation to the different responses found in the different growth phase of both haploid and diploid *S. cerevisiae* strains. The strong cytotoxic effect induced by APO in early-exponential phase could be related to catabolic repression of some kind of genes involved in defense mechanisms. The mid-exponential phase of growth may correspond to initial derepression, where the respiratory adaptation begins, and the cells became more resistant to deleterious effect induced by APO. Besides that, the yeast in exponentially growing normally presents high level of cytochrome P-450 metabolic activation system (ZIMMERMANN *et al.*, 1984), which may contribute to APO toxicity. The weakest cytotoxic and genotoxic effects shown by stationary phase, could be due to another mechanism, not involving catabolic repression. The increased antioxidant status after respiratory adaptation is probably a contributing factor to the increased oxidative-stress tolerance of stationary-phase of growth in yeast (JAMIESON *et al.*, 1994; STEELS *et al.*, 1994). On the other hand, the changes in the walls of yeast in exponential phase could contribute to APO cytotoxicity and genotoxicity, as it was already demonstrated by a variety of other compounds (MELO *et al.*, 1986; VON POSER *et al.*, 1990; MORENO *et al.*, 1991; PASQUAL *et al.*, 1993).

The ploidy effect was only observed on exponentially growing cells (Table 1.4 and 2.4). Absence of ploidy effect in stationary phase was probably due to the higher antioxidant status in this phase in comparison to exponential phase of growth (JAMIESON *et al.*, 1994). The higher APO resistance observed in the diploid cells could be due to its ability to eliminate the damages induced by this alkaloid via recombinogenic repair mechanisms. This mechanism used by cells could help survival to lethal effects of APO, but on the other hand, it could increase recombination response (PETES *et al.*, 1991). The frequency of recombinants (CYH<sup>+</sup>) was increased by APO (Table 2.4), showing a clear recombinogenic effect of this alkaloid. However, the frequency of convertants induced by APO in diploid cells was closed to the expontaneous rate (Table 2.4). The increase of recombinogenic events could be related with the interaction of the autoxidation APO-reactive products with DNA, leading to DNA double strand-breakes and increasing the number of crossing over. Quinone can be generated during APO autoxidation. This reactive molecule may be toxic to cells by a number of mechanisms including redox cycling, arylation, intercalation, induction of DNA strand breaks, generation of site-specific free radicals and interference with mitochondrial respiration (KALYANARAMAN *et al.*, 1985; MONKS *et al.*, 1992).

As observed in diploid yeast cells, the genotoxic effect induced by APO in haploid yeast cells took place only in mid-exponential phase of growth. The frequency of point mutation (*his1* and *lys1*) remains unchanged, while the

frameshift mutation (*hom3-10*) is increased by a factor of 25 (Table 1.4). Also in the Ames test APO was found to be weakly mutagenic on TA1535 (SUTER & MATTER-JAEGER, 1984), and on TA97 (CKLESS *et al.*, 1996), which detect frameshift mutation. This effect could also be related with DNA-quinones interaction, such as arylation, intercalation, induction of DNA strand-breaks (KALYANARAMAN *et al.*, 1985; MONKS *et al.*, 1992).

In the presence of reduced glutathione (GSH), the cytotoxic and genotoxic effects of APO were reduced or eliminated (Fig. 1.4, Table 3.4). The protective effect of GSH was more pronounced in early- than mid-exponential phase of diploid cells. This effect could be explained in three ways: (a) GSH could prevent autoxidation of APO out of the cells; (b) the cells could uptake GSH, increasing the cellular defenses against deleterious effects of APO; and (c) both hypothesis could simultaneously take place. In addition, GSH strongly reduced the mutagenicity and toxicity induced by APO on *Salmonella thiphymurium* strains (SUTER & MATTER-JAEGER, 1984). Besides that, this tripeptide also reduced the dark green color observed after APO autoxidation (date not shown). The presence of this reducing agent also prevent oxidation of APO solution *in vitro* (CKLESS *et al.*, 1996). These observations along with the fact that the antioxidant defenses are reduced in exponentially growing yeast cells lead us to suggest that the cytotoxicity and genotoxicity of APO is mainly dependent of its oxidation products. However, further studies on molecular



mechanisms of APO toxicity need to be analyzed in different biological systems.

*Acknowledgments:* We thank Cleri Shirlei Mosmann and Suzanly Candal Tso for experimental helpfull of this work. This work was supported by grants from Brazilian Agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and laboratório de Genotoxicidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Genotox).

## REFERENCES

- VON BORSTEL, R.C.; CAIN, K.T. & STEINBERG, C.M. (1971) Inheritance of spontaneous mutability in yeast. *Genetics*, **69**:17-27.
- CKLESS, K.; PASCOAL, M.S.; LEYGUE-ALBA, N.M.R. AND HENRIQUES, J.A.P. (1996) Apomorphine: chemical studies and mutagenic response in the Salmonella mutagenicity assay. Manuscript in preparation.
- COHEN, G. & HEIKKILA (1974) The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, diluric acid and related cytotoxic agents. *J. Biol. Chem.*, **249**:2447-2452.
- GANCEDO, J.M. (1992) Carbon catabolite repression in yeast. *Eur. J. Biochem.*, **206**:297-313.
- GANCEDO, C. & SERRANO, R. (1989) Energy-yielding metabolism. In: HARRISON, J.S. & ROSE, A.H. (eds.) *The yeast.*, vol.3, Academic Press, New York. p.205-259.
- GANCHER, S.T. (1995) Dopamine agonists under investigation including apomorphine. In: KOLLER, W.C. & PAULSON, G. (eds) *Therapy of Parkinson s disease*. 2ed. Marcel Decker, inc. New York. p.273-286.
- HAWTHORNE, D.C. (1969) Identification of nonsense codons in yeast. *J. Mol. Biol.*, **43**:71-75.
- HAWTHORNE, D.C. & MORTIMER, R.K. (1963) Supressors in yeast. *Genetics*, **48**:617-620.
- JAMIESON, D. J.; RIVERS, S.L. & STEPHEN, D.W.S. (1994) Analysis of *Saccharomyces cerevisisae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiol.*, **140**: 3277-3283.
- KAPPUS, H. & SIES, H. (1981) Toxic drug effects associated with oxygen metabolism:redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia* **37**:1233-1241.
- KALYANARAMAN, B.; FELIX, C.C. & SEALY, R.C. (1985) Semiquinone anion radicals of catechol(amine)s, catechol estrogens and their metal ion complexes. *Environm. Health Persp.*, **64**:185-198.

- LAGUNAS, R. (1986) Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **2**:221-228.
- MACHIDA, I. & NAKAI, S. (1980) Induction of spontaneous and UV-induced mutation during commitment to meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mut. Res.*, **73**:59-68.
- MARTINEZ, L.A.; RÍOS, J.L.; PAYA, M. & ALCARAZ, M.J. (1992) Inhibition of nonenzymic lipid peroxidation by benzyloisoquinoline alkaloids. *Free Radic. Biol. Med.*, **12**:287-292.
- MASON, R.P. (1979) Free radical metabolites of foreign compounds and their toxicological significance. In: HODGSON, E.; BEND, J.R. & PHILPOT, R.M. (eds), *Rev. Biochem. Toxicol.* pp 151-200.
- MELO, A.A.; QUEROL, C.B.; HENRIQUES, A.T. & HENRIQUES, A.T. (1986) Cytostatic, cytotoxic and mutagenic effects of voacristine, an indole alkaloid in wild type and repair deficient yeasts. *Mut. Res.*, **171**:17-24.
- MONKS, T.J.; HANZLINK, R.; COHEN, G.M.; ROSS, D. & GRAHAM, D. (1992) Contemporary issues in toxicology. Quinone chemistry and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **112**:2-16.
- MORADAS-FERREIRA, P.; COSTA, V.; PIPER, P. & MAGER, W. (1996) The molecular defenses against reactive oxygen species in yeast. *Mol. Microbiol.*, **19**:651-658.
- MORELLO, A.; LIPCHENCA, I.; CASSELS B.K.; SPIESKY, H.; ADUNATE, J. & REPETTO, Y. (1994) Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **107C**:367-371.
- MORENO, P.R.H.; VARGAS, V.M.F.; ANDRADE, H.H.R.; HENRIQUES, A.T. & HENRIQUES, J.A.P. (1991) Genotoxicity of boldine aporphine alkaloid in prokaryotic and eukaryotic organisms. *Mut. Res.*, **260**:145-152.
- NEUMEYER, J.L.; LAL, S. & BALDESSARINI, R.J. (1981) Historical highlights of the chemistry, pharmacology and early clinical uses of apomorphine. In: GESSA, G.L. & CORSINI, G.U. (eds), *Apomorphine and other Dopamimetics*, vol 1, Basic Pharmacology, Raven Press, New York, pp 1-17.
- NEUMEYER, J.L. (1985) Synthesis and structure-activity relationships of aporphines as dopamine receptor agonists and antagonists. In: *Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 146-170pp.

- PASQUAL, M. P.; LAUER, C. P., MOYNA, P. & HENRIQUES, J.A.P. (1993) Genotoxicity of the isoquinoline alkaloid berberine in prokaryotic and eukaryotic organisms. *Mut. Res.*, **286**:234-252.
- PETES, T.D.; MALONE, R.E. & SYMINGTON, L.S. (1991) Recombination in yeasts. In: *The Molecular and Cellular Biology in the Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis and energetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp. 407-521.
- POTHIN, H.S.; DA SILVA, K.V.C.L.; BRENDDEL, M. & HENRIQUES, J.A.P. (1994) Genetic effects of photoactivated psoralens during meiosis in the DNA repair mutant *psb3-1* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, **25**:19-23.
- VON POSER, G.; ANDRADE, H.H.R.; DA SILVA, K.V.L.; HENRIQUES, A.T. & HENRIQUES, J.A.P. (1990) Genotoxic, mutagenic and recombinogenic effects of rauwolfia alkaloids. *Mut. Res.*, **232**:37-43.
- RÍOS, J.L.; SIMEÓN, S. & VILLAR, A. (1989) Pharmacological activity of aporphinoid alkaloids. A review. *Fitoterapia*, **60**:387-412.
- SAM, E.; AUGUSTIJNS, P. & VERBEKE, N. (1994) Stability of apomorphine in plasma and its determination by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chrom. B*, **658**:311-317.
- SCHUELLER, R.C. & VON BORSTEL, R.C. (1974) Spontaneous mutability in yeast. I. Stability of lysine reversion rates to variation of adenine concentration. *Mut. Res.*, **24**:17-23.
- SHAMA, M. (1972) The aporphines. In: *The Isoquinolines Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*. Academic Press, New York and London, pp 194-228.
- SIMEÓN, S.; RÍOS, J.L. & VILLAR, A. (1989) Pharmacological activities of protoberberines alkaloids. *Planta Med. Phytoter.*, **XXIII**, 202-250.
- SNOW, S. (1978) Absence of suppressible alleles at the *his1* locus of yeast. *Mol. Gen. Genet.*, **164**:341-342.
- STEELS, E.L.; LEARMONTH, R.P. & WATSON, K. (1994) Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiol.*, **140**:569-576.

- SULLIVAN, ST. G. & STERN (1981) Effects of superoxide dismutase and catalase on catalysis of 6-hydroxydopamine autoxidation by iron and ascorbate. *Biochem. Pharmacol.*, **30**:2279-2285.
- SUTER, W. & MATTER-JAEGER, I. (1984) Genotoxicity of apomorphine and various catecholamines in the Salmonella mutagenicity (Ames test) and in tests for primary DNA damage using repair-deficient *B. subtilis* strains (Rec assay). *Mut. Res.*, **137**:17-28.
- UBEDA, A.; MONTESINOS, C. PAYÁ, M. & ALCARAZ, M.J. (1993) Iron-reducing and free radical scavenging properties of apomorphine and some related benzyloquinolines. *Free Rad.in Biol. Med.*, **15**:159-167.
- WARDMAN, P.; DENNIS, M.F.; EVERETT, S.A.; PATEL, K.B.; STRATFORD, M.R.L. & TRACY, M. (1995) Radical from one-electron reduction of nitrocompounds, aromatic *N*-oxides and quinones: the kinetics base for hypoxia-selective, bioreductive drugs. *Biochem. Soc. Symp.*, **61**:171-194.
- WEUSTHUIS, R.A.; VISSER, W.; PRONK, J.T.; SCHEFFERS, W.A. & VAN DIJKEN, J.P. (1994) Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluyver effect. *Microbiol.*, **140**:703:715.
- WICK, M.M. & FITZGERALD, G. (1981) Inhibition of transcriptase by tyrosinase generated quinones related to levodopa and dopamine. *Chem-Biol. Interact.* **38**:99-107.
- ZIMMERMANN, F.K.; VON BORSTEL, R.C.; VON HALLE, E.S.; PARRY, J.M.; SIEBERT, D.; ZEITERBERG, G.; BARLE, R. & LOPRIENO, H. (1984) Testing of chemical for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*: a report of the US Environmental protection Agency Gene-Tox Program. *Mut. Res.*, **104**:87-94.

TABLE 1.4

INDUCTION OF FRAMESHIFT (*hom3-10*) AND POINT MUTATION (*lys1-1; his1-7*) IN HAPLOID STRAIN XV185-14c OF *S. cerevisiae* AFTER APOMORPHINE TREATMENT

Mid-exponential phase of growth	APO ( $\mu\text{g/ml}$ )	Survival (%)	<i>His1</i> / $10^7$ survivors	<i>Lys1</i> / $10^7$ survivors	<i>Hom3</i> / $10^7$ survival
	0	100.0 (630) <sup>a</sup>	33.3 $\pm$ 3.8 <sup>b</sup> (210)	4.2 $\pm$ 1.3 (26)	2.0 $\pm$ 0.5 (12)
	25	105.0 (661)	22.5 $\pm$ 0.0 (148)	3.7 $\pm$ 0.8 (24)	5.0 $\pm$ 0.5 (33)
	50	34.6 (417)	42.8 $\pm$ 6.5 (177)	8.3 $\pm$ 0.5 (33)	23.2 $\pm$ 2.7 (96)**
	75	7.8 (49)	24.3 $\pm$ 8.2 (12)	12.2 $\pm$ 1.9 (6) *	16.6 $\pm$ 3.3 (8)**
	100	1.0 (7)	25.3 $\pm$ 9.0 (2)	-	50.6 $\pm$ 6.6 (4) **
<b>Stationary phase of growth</b>					
	0	100.0 (720)	28.0 $\pm$ 3.3 (202)	2.8 $\pm$ 0.2 (20)	2.3 $\pm$ 0.6 (16)
	25	105.0 (756)	24.0 $\pm$ 2.3 (120)	2.4 $\pm$ 0.9 (18)	2.5 $\pm$ 0.2 (18)
	50	107.0 (770)	15.6 $\pm$ 1.2 (117)	1.6 $\pm$ 0.2 (12)	1.0 $\pm$ 0.1 (8)
	75	32.7 (235)	20.0 $\pm$ 6.6 (47)	3.6 $\pm$ 0.6 (8)	4.0 $\pm$ 0.1 (9)
	100	23.7 (171)	16.6 $\pm$ 9.4 (29)	-	4.5 $\pm$ 0.3 (7)**

<sup>a</sup> Number in parentheses are the actual numbers of colonies scored in three plates

<sup>b</sup> Standard deviation

\* Genetic frequencies significant at the 0.5 % level

\*\* Genetic frequencies significant at the 0.1% level

TABLE 2.4

INDUCTION OF CROSSING-OVER (+/*cyh*) AND GENE CONVERSION (*leu1-1/leu1-12*) IN DIPLOID STRAIN XS2316 OF *S. cerevisiae* AFTER APOMORPHINE TREATMENT

	APO ( $\mu\text{g/ml}$ )	Survival (%)	Gene Conversion per $10^5$ survivors	Crossing over per $10^5$ survivors
<b>Early-exponential phase of growth</b>				
	0	100.0 (1110)	$2.5 \pm 0.4$ (28)	$18.0 \pm 1.4$ (208)
	20	77.0 (840)	$1.1 \pm 0.4$ (10)	$25.5 \pm 2.5$ (216)
	40	51.3 (563)	$0.5 \pm 0.2$ (3)	$19.5 \pm 0.7$ (112)
	60	4.0 (46)	-	$135.6 \pm 10.5$ (61) **
<b>Mid-exponential phase of growth</b>				
	0	100.0 (755) <sup>a</sup>	$9.8 \pm 0.7^b$ (72)	$36.5 \pm 2.0$ (273)
	25	100.6 (760)	$8.5 \pm 1.4$ (63)	$37.0 \pm 2.7$ (281)
	50	49.5 (374)	$10.1 \pm 2.1$ (38)	$61.0 \pm 1.5$ (227) **
	75	36.9 (279)	$10.4 \pm 2.0$ (29)	$104.0 \pm 3.4$ (291) **
	100	28.6 (216)	$10.4 \pm 0.6$ (22)	$91.0 \pm 2.0$ (195) **
<b>Stationary phase of growth</b>				
	0	100.0 (819)	$3.3 \pm 0.5$ (27)	$39.3 \pm 3.5$ (321)
	25	103.0 (843)	$4.1 \pm 1.1$ (33)	$27.2 \pm 1.2$ (228)
	50	98.3 (805)	$3.2 \pm 1.2$ (25)	$39.5 \pm 2.3$ (315)
	75	63.3 (518)	$6.7 \pm 2.3$ (34)	$50.6 \pm 1.1$ (261)
	100	36.6 (301)	$7.7 \pm 2.7$ (23)	$81.1 \pm 3.1$ (243) **

<sup>a</sup> Number in parentheses are the actual numbers of colonies scored in three plates

<sup>b</sup> Standard deviation

\*\* Genetic frequencies significant at the 0.1% level

TABLE 3.4

INDUCTION OF CROSSING-OVER (+/*cyh*) AND GENE CONVERSION (*leu1-1/leu1-12*) IN EARLY EXPONENTIAL AND EXPONENTIAL PHASE OF DIPLOID STRAIN XS2316 OF *S. cerevisiae* AFTER APOMORPHINE TREATMENT IN THE PRESENCE OF GLUTATHIONE (100  $\mu$ g/ml)

	APO ( $\mu$ g/ml)	Survival (%)	Gene Conversion per $10^5$ survivors	Crossing over per $10^5$ survivors
<b>Early-exponential phase of growth</b>				
	0	100.0 (829) <sup>a</sup>	$2.8 \pm 0.4^b$ (25)	$25.0 \pm 1.7$ (220)
	20	95.0 (849)	$1.5 \pm 0.5$ (20)	$25.3 \pm 0.5$ (217)
	40	80.0 (705)	$1.7 \pm 0.7$ (12)	$32.0 \pm 1.7$ (222)
	60	75.0 (683)	$2.0 \pm 0.9$ (13)	$36.0 \pm 6.0$ (239)
	100	20.1 (173)	$2.8 \pm 2.0$ (05)	$97.3 \pm 6.8$ (167) **
<b>Mid-exponential phase of growth</b>				
	0	100 (819)	$19.0 \pm 1.4$ (151)	$77.7 \pm 3.7$ (629)
	25	90 (729)	$21.8 \pm 0.6$ (160)	$75.3 \pm 2.3$ (553)
	50	92 (745)	$20.6 \pm 3.4$ (154)	$51.0 \pm 6.1$ (378)
	75	87 (704)	$17.0 \pm 2.3$ (120)	$54.0 \pm 2.5$ (368)
	100	81 (657)	$11.0 \pm 1.0$ (72)	$56.0 \pm 7.0$ (378)

<sup>a</sup> Number in parentheses are the actual numbers of colonies scored in three plates

<sup>b</sup> Standard deviation

\*\* Genetic frequencies significant at the 0.1% level



## LEGENDS OF FIGURES

Figure 1.4. Cytotoxic effect of apomorphine in diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain XS2316. The inhibition of colony-forming ability was verified on exponential (circle symbol) and early-exponential (square symbol) phase of growth in the presence (closed symbol) or in the absence (open symbol) of glutathione during incubation as described in the methodology. Results represents mean of, at least, three representative experiments.

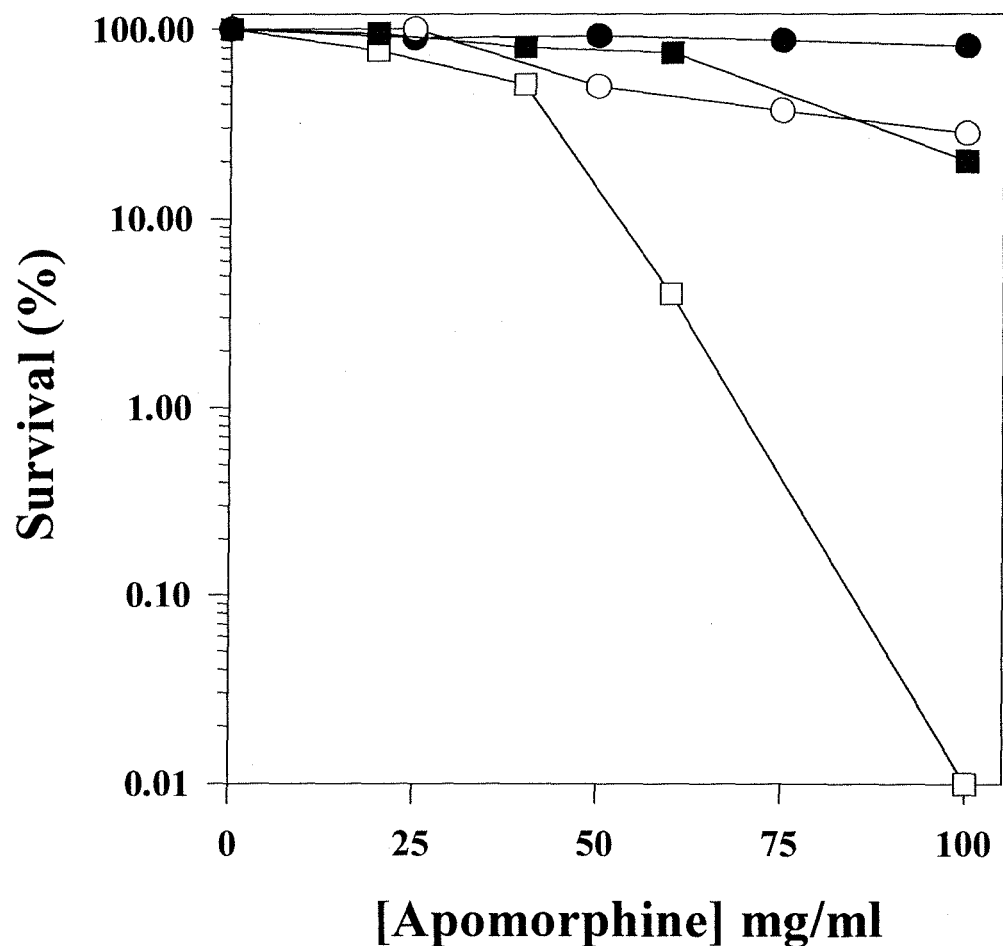


Figure 1.4. Cytotoxic effect of apomorphine in diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain XS2316. The inhibition of colony-forming ability was verified on exponential (circle symbol) and early-exponential (square symbol) phase of growth in the presence (closed symbol) or in the absence (open symbol) of glutathione during incubation as described in the methodology. Results represents mean of, at least, three representative experiments.

## **5 - CAPÍTULO 3**

### **AUTOXIDATION AND CYTOTOXICITY OF APOMORPHINE: INVOLVEMENT OF IRON AND HYDROGEN PEROXIDE**

## **AUTOXIDATION AND CYTOTOXICITY OF APOMORPHINE: INVOLVEMENT OF IRON AND HYDROGEN PEROXIDE**

Ckless, K.<sup>1</sup>; Souza-Pinto, N.C.<sup>2</sup>; Henriques, J.A.P.<sup>3</sup> and Hoffmann, M.E.<sup>2</sup>

1 -Centro de Biotecnologia, Depto. de Bioquímica, UFRGS; Porto Alegre - RS -Brasil.

2 - Depto. de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP; Campinas - SP-Brasil.

3- Centro de Biotecnologia, Depto de Biofísica, UFRGS; Porto Alegre - RS - Brasil.

Correspondence: Dr. M. E. Hoffmann

Fone: 55-019-239 7953

Fax: 55-019-239 3124

Departamento de Bioquímica

Instituto de Biologia

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Caixa postal 6109

13083-970 - Campinas - SP - Brasil

## ABSTRACT

Apomorphine is an efficient dopamine agonist, widely used as an inducer of stereotyped behavior in experimental animals and in the therapy of movement disorders. In this study we investigated the toxicity of apomorphine on Chinese hamster fibroblasts (V79 line) searching for a linkage between this mechanism and the spontaneous oxidative degradation of the alkaloid. The autoxidation of apomorphine, followed spectrophotometrically and through oxygen consumption measurements, was highly enhanced in presence of iron, in a dose-dependent way (10-50  $\mu\text{M}$ ). Also the production of superoxide radical anion was strongly stimulated by iron. Apomorphine (25-300  $\mu\text{M}$ ) induced a dose-dependent inhibition of cell growth subsequently to the exposure. This effect was enhanced in the presence of iron, but was not reduced in presence of catalase (250 U/ml), indicating that a Fenton-type reaction should not be underlying the production of toxic damages. We conclude therefore, that reactive apomorphine oxidants, rather than reactive oxygen species, might be mediating apomorphine toxicity to V79 cells.

**Keywords:** Apomorphine. Autoxidation. Cytotoxicity. Iron. V79 cells.

## INTRODUCTION

Apomorphine (APO) is a synthetic alkaloid obtained by acid-catalized rearrangement of morphine, used for a long time as an efficient emetic agent in cases of poisoning [see 1 for review]. Presently, a renewed interest in the pharmacology of APO arose from its characterization as a dopamine agonist [2], widely used to induce stereotyped behavior in experimental animals and in the treatment of movement disorders, like Parkinson's disease [3]. Similarly to dopamine, the presence of a catechol moiety in APO structure, renders it easily oxidizable in aerobic aqueous solutions forming the corresponding *ortho*-quinone [4]. Concerning catecholamines, it is well known that their abilities to autoxidize generating reactive oxygen species and *ortho*-quinones are correlated with their toxicological properties [5-7]. Although the structural similarity of APO with catecholamines strongly suggest a prooxidant behavior, the few reports concerning its redox activities in biological systems are really controversial. In contrast to catecholamines, APO has shown to be able to induce frameshift mutations in *Salmonella typhimurium*, according to the Ames test [8], and its mutagenic action was attributed to products of its autoxidation. However, recent studies designed to identify benzyloquinoline alkaloids with antioxidant properties showed that APO presents antioxidative properties [9, 10]. In contrast, it has been recently shown that APO increased deoxyribose degradation and stimulated DNA damage production by  $\text{Cu}^{2+}$ , therefore acting as prooxidant [11]. Furthermore, recent data on the tripanocidal effects of

aporphine alkaloids distinguished APO as the most toxic drug to *Trypanosoma cruzi* suggesting its potential application as an antitripanosomal drug in the treatment of Chagas disease [12]. Nevertheless, information is lacking on the cytotoxicity of APO to mammalian cells.

The few biochemical and toxicological data about APO, led us to investigate the cytotoxicity of apomorphine to V79 Chinese hamster fibroblasts. In order to establish the possible involvement of reactive oxygen species in that mechanism, we analysed the production of such species during APO autoxidation. Because of the well established iron effectiveness as catalyst of autoxidation and redox reactions in biological systems [13-15] we searched for the involvement of this metal in the mechanisms of APO autoxidation and cytotoxicity.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Chemicals*

Catalase (EC 1.11.1.6) from bovine liver and nitro blue tetrazolium (NBT) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); Apomorphine from Merck (Darmstadt, West Germany), thymidine-[methyl-<sup>3</sup>H] (50-80 Ci/mMol) from New England Nuclear (Boston, MA, USA); Dulbecco's modified Eagle's medium from ICN Flow Biomedicals Inc (Costa Mesa, CA,

USA); fetal calf serum and antibiotics from Cultilab (Campinas, SP, Brazil).

All other reagents were purchased from analytical grade.

### *APO degradation*

Spectra of APO solutions were recorded with a DW 2000 UV/visible Aminco spectrophotometer. Absorption measurements were started by addition of aliquots of a 100 mM APO stock solution in DMSO to 1.0 ml PBS into a 1.0 cm path cuvette, to 1.0 mM final concentration. APO oxidation rate was determined following the linear increase from absorption at  $\lambda = 415$  nm at different times. The influence of iron in APO-oxidation rate was analyzed by adding aliquots of a fresh prepared 10 mM  $\text{FeCl}_3$  aqueous solution to the final concentrations specified in the figure.

### *Oxygen consumption*

The rate of oxygen uptake by APO solutions (0.5 and 1.0 mM in PBS) was measured in a 1.2 ml temperature-controlled glass chamber at 28°C, using a Clark type electrode (Yellow Springs Instruments Co) equipped with a magnetic stirrer. The electric signal was collected in a amperometric apparatus connected to a potentiometric register. Measurements were started by addition of aliquots of a 100 mM APO stock solution in DMSO. The effect of iron in oxygen consumption rate was analysed by measuring  $\text{O}_2$ -uptake by 1.0 mM APO solutions containing 10, 25 and 50  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$ . In order to check the generation



of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during APO, autoxidation catalase (250 U/ml) was added to the oxidized solution containing 10 μM Fe<sup>3+</sup>.

#### *Detection of superoxide anion radical*

Superoxide radical production was assessed spectrophotometrically by monitoring nitro blue tetrazolium (NBT) reduction to insoluble formazan blue. Reactions were started by addition of aliquots of a APO stock solution (100 mM in DMSO) to 1.0 ml PBS containing 0.25 mM NBT. After 120 min incubation at room temperature the formazan granules were pelleted, dissolved in dimethylformamide, and read at 560 nm.

#### *Cell culture*

V79 Chinese hamster lung fibroblasts, an M8 clone kindly supplied by Dr. R. Meneghini from the University of Sao Paulo (Sao Paulo, SP, Brazil), were routinely grown in DMEM containing antibiotics (100 U/ml penicillin G; 100 μg/ml streptomycin) and supplemented with 10 % fetal calf serum, in a 5 % carbon dioxide humidified atmosphere, at 37 °C.

#### *Cell growth assay*

Assays were performed with cells in the exponential phase of growth. Cells were seeded in 24 well-plates (from Corning), at a density of 3x10<sup>4</sup> cells/well, and incubated in complete medium for 44 hr. Exposure to APO (25-300 μM) was performed in phosphate-buffered saline containing 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>

(PBS), for 30 min at 37 °C. APO solutions were prepared at the desired concentrations, immediately before addition to cultures, by dilution of a 10.0 mM stock solution in DMSO. After treatment, cells were washed twice with PBS and incubated in fresh medium for a further 24 hr period. At the end of this growth period cells were lysed with 0.5 M NaOH (1.0 ml/well). Cell population was determined by measuring lysate absorbance at 260 nm, a parameter directly correlated with cell number, in the range of  $10^5$ - $10^6$  cells. Relative proliferation was expressed in percentage of the population increased during the growth period, according to control cultures. Protection experiments with CAT were performed by adding the enzyme (250 U/ml) to the exposure medium prior to the addition of APO.

## RESULTS

### *Role of iron in APO autoxidation*

The APO *o*-dihydroxy group enable metal chelating, leading to the possibility of iron catalysis of APO autoxidation reaction. We have tested this hypothesis investigating the effect of iron on the oxidative degradation of APO, by spectrophotometric methods. APO has shown to be able to oxidize slowly in aqueous solution, as evidenced by the peak observed at 415 and 625 nm (Figure 1.5). This figure presents spectra of a 1.0 mM APO solution in PBS after different increasing time (0-60 min) at room temperature, showing a time-dependent appearance of a oxidized product, presumably the *o*-quinone. The

effect of iron in the yielding of the oxidative product was followed at 415 nm. Figure 2.5 shows the strong potentiative effect of  $\text{Fe}^{3+}$  (10 - 50  $\mu\text{M}$ ), in a dose-dependent manner, in the oxidative degradation of APO. The low oxidation rate of APO in the absence of iron could be attributable to trace amounts of contaminant metal in the medium. In addition, no detectable degradative product was observed at pH 5.0, evidencing the stability of APO in acid media.

The role of iron in APO oxidation was further investigated by measuring oxygen uptake by APO solutions. Figure 3.5 shows oxygen consumption patterns of a 1.0 mM APO solution in PBS (line **a**) followed for 15 min, as well as the enhancement of oxygen uptake rates in presence of increasing  $\text{Fe}^{3+}$  concentrations (lines **b**, **c** and **d** ; 10, 25 and 50  $\mu\text{M}$  respectively). Oxygen consumption rates (in nmoles/min) obtained from this curve were 2.68, 3.04, 3.92 and 4.49, for line **a**, **b**, **c**, and **d** respectively. At the higher iron concentration it was observed a 1.7 fold enhancement on oxygen consumption rate. Dissolved oxygen (in 1.0 mM APO solution in PBS) was not completely depleted even after 2 hrs of incubation (data not shown). Moreover, the addition of catalase to the oxidized APO solution increased the oxygen concentration in solution (line **b**, addition indicated by the arrow), indicating that hydrogen peroxide has been produced during APO oxidation. Measurement of superoxide anion production through the reduction of NBT further confirmed the generation of reactive oxygen species during APO autoxidation, as well as the stimulating effect of iron ion in the process (Figure

4.5). The production of superoxide anion, followed by measurement of the blue formazan absorbance at 560 nm, showed to be dependent on the concentration of both, APO and  $\text{Fe}^{3+}$  (Figure 4.5).

*Cytotoxicity of APO to V79 cells: role of iron and hydrogen peroxide*

Cytotoxicity of APO to V79 fibroblasts was assessed by measuring the inhibitory effect of this alkaloid upon cell proliferation rate. A short exposure of the cultures to APO solutions in PBS (25-300  $\mu\text{M}$ ) caused a strong inhibition of cell growth within the subsequent 24h period, in a dose-dependent way (Figure 5.5). This figure also shows that the inhibitory effect of APO on cellular proliferation was not prevented by addition of catalase to the exposure medium, suggesting that hydrogen peroxide is not involved to its toxicity mechanism.

The finding that iron stimulated both APO degradation and superoxide anion production, lead us to ascertain if it was also able to potentiate APO cytotoxicity. The addition of increasing  $\text{Fe}^{3+}$  concentrations (10, 25 and 50  $\mu\text{M}$ ) to the assays produced an increase of cell proliferation inhibition induced by 50  $\mu\text{M}$  APO, in a dose-dependent way (Figure 6.5), suggests that iron is critical for cytotoxicity.

## DISCUSSION

Because of the spin restriction of dioxygen autoxidation reactions of most biomolecules, such as catecholamines, are thought to be catalyzed by transition metals bound to the molecules [14, 16]. Since *o*-hydroxy binds of APO molecule are well suited for metal binding, we looked for the role of iron ions in APO autoxidation reaction. APO oxidation in neutral medium was indeed strongly accelerated by iron, as showed by: *i*) the dose-dependent enhancement of APO degradation rate by  $\text{Fe}^{3+}$ ; *ii*) the increased rates of oxygen consumption by APO solutions containing  $\text{Fe}^{3+}$ ; and *iii*) the enhanced production of superoxide anion radical during APO autoxidation in presence of  $\text{Fe}^{3+}$ . In that way, and accordingly to the hypothesis of Miller et al. [14], we propose that APO autoxidation is, in fact, an iron-catalyzed oxidative degradation. Additionally, the detection of superoxide anion radical production during this process points to the occurrence of an one-electron transfer to oxygen, with simultaneous formation of an APO *o*-semiquinone radical, likely to found to other structurally related catechols [16]. The autoxidation reaction was negligible at low pH, where the neutral form of APO had predominated over the anionic one, thus indicating that a desprotonation step should precede an APO oxidation. The subsequent APO *o*-semiquinone oxidation would lead to production of the corresponding *o*-quinone, according to the scheme showed in the Figure 7.5.

Since iron, as other transition metals, is also capable of complexation with dioxygen [17], it might be acting as an effective bridge between APO oxidative intermediate molecules and oxygen, granting one-electron transfer reactions.

Strikingly, we found that APO was very toxic to V79 fibroblasts, causing a dose-dependent inhibition of cell proliferation, even in the absence of exogenous iron. Additionally, the presence of  $\text{Fe}^{3+}$  (10-50  $\mu\text{M}$ ) to the medium enhanced the inhibitory effect of APO on cell growth, thus suggesting a linkage between the mechanisms of APO autoxidation and cytotoxicity. Although an association has been found between the production of superoxide anion radical and the stimulation of APO autoxidation by iron, the complete inability of catalase to protect the cells against APO-induced toxicity, indicated that hydrogen peroxide has not been involved in the production of oxidative cell damage. This result suggests that a Fenton-type reaction should not be mediating APO cytotoxicity mechanisms. Therefore it is indicated that other reactive oxidants, unlike reactive oxygen species, ought be responsible for induction of the toxic cell injuries. Regarding to dopamine, it has been recently shown that toxicity is dependent on the production of *o*-quinones, which can bind to nucleophilic groups of proteins [7, 18]. Likewise, it can be assumed that reactive metabolites of APO, generated during iron-catalyzed oxidation, could be underlying its cytotoxicity to V79 cells, via nucleophilic addition reactions

with biomolecules. The relative low half-life of APO in plasma (39 min), a result of its instability in physiological conditions [19], states for its probable breakdown *in vivo*, thereby generating toxic metabolites.

Our results are in agreement with other reports on APO toxicity to *Trypanosoma cruzi* [11] and bacteria [8], and conversely, appear to be against APO antioxidant properties [9, 10]. This apparently contrasting behavior of APO seems to be a common feature of polyphenols, which were recently characterized as prooxidant as well as antioxidant in biological systems [20-22]. In the case of catechols, their prooxidant and antioxidant activities have been correlated with the presence or absence of metal ions [20], or even with high or low concentrations, respectively [22]. Another recent report on structure-activity relationships of aporphines, their antioxidant property was attributed to the presence of the biphenyl ring rather than the phenolic groups [10]. Indubitably, additional studies are required to clear the mechanisms underlying APO activities in biological systems. Meanwhile, attention should be given to the possible occurrence of APO side-effects *in vivo*.

In fact, it has been recently shown that, besides its antiparkinsonian effects, APO induced marked hyperactivity in parkinsonian monkeys, such as irritability and aggressiveness [23]. Moreover, a recent report on iron toxicity to rats showed that iron infusion into the substantia nigra can lead to progressive neurotoxic effects, including an increase of APO-induced rotational

behavior in animals, through out 6 months postinfusion [24]. Although it is well known that free-iron concentration in biological systems is very low, the possibility exists that it can be enhanced in pathological conditions, such as in oxidative stress, due to iron release from storing proteins [25]. Additionally, the iron-releasing ability of catechols [26] suggests that APO could be acting on iron-sequestration from ferritin leading to an enhancement of its oxidative degradation. Together with these findings, our results forewarn against possible neurotoxic effects decurrent from the clinical use of APO in humans.

*Acknowledgments:* We thank Ms. Izaura M. Lemos for helpfull reading of this manuscript. This work was supported by grants from Brazilian Agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and laboratório de Genotoxicidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Genotox).



## REFERENCES

1. Neumeyer JL, Lal S and Baldessarini RJ, Historical highlights of the chemistry, pharmacology, and early clinical uses of apomorphine. In: *Apomorphine and other Dopaminomimetics* (Eds GL Gessa and GU Corsini), vol 1, Basic Pharmacology, Raven Press, New York, pp 1-17, 1981.
2. Neumeyer JL, Synthesis and structure-activity relationships of aporphines as dopamine receptor agonists and antagonists. In: *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids* (Eds Phillipson et al.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 146-170, 1985.
3. Colosimo C, Merello M and Albanese A, Clinical usefulness of apomorphine in movement disorders. *Clinical Neuropharmacol* **17**: 243-259, 1994.
4. Shama M, The aporphines. In: *The isoquinoline alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, Academic Press, New York and London, pp 194-228, 1972.
5. Cohen G and Keikkila RE, The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid and related cytotoxic agents. *J Biol Chem* **249**: 2447-2452, 1974.
6. Graham DC, Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanins and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol* **14**: 633-643, 1978.
7. Zhang F and Dryhurst G, Oxidation chemistry of dopamine: Possible insights into the age-dependent loss of dopamineergic nigrostriatal neurons. *Bioorganic Chemistry* **21**: 392-410, 1993.
8. Suter W and Matter-Jaeger I, Genotoxicity of apomorphine and various catecholamines in the Salmonella mutagenicity test (Ames test) and in test for primary DNA damage using DNA repair-deficient *B. subtilis* strain (Rec assay). 1984. *Mut. Res* **137**: 17-28, 1984.
9. Martinez LA, Ríos JL, Payá M and Alcaraz MJ, Inhibition of nonenzymic lipid peroxidation by benzyloisoquinoline alkaloids. *Free Rad. Biol Med* **12**: 287-292, 1992.

10. Cassels BK, Asencio M, Conget P, Speisky H, Videla LA and Lissi EA, Structure-antioxidative activity relationships in benzyloisoquinoline alkaloids. *Pharmacol. Res.* **31**: 103-107, 1995.
11. Ubeda A, Montesinos C, Payá M and Alcaraz MJ, Iron-reducing and free radical scavenging properties of apomorphine and some related benzyloisoquinolines. *Free Rad. Biol Med* **15**: 159-167, 1993.
12. MorelloA, Lipchenca I, Cassels BK, Speisky H, Adunate J and Repetto Y, Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol* **107C**: 367-371, 1994.
13. Aust SD, Morehouse LA and Thomas CE, Role of metals in oxygen radical reactions. *J Free Rad. Biol Med* **1**: 3-25, 1985.
14. Miller DM, Buettner GR and Aust SD, Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Rad. Biol Med* **8**: 95-108, 1990.
15. Stohs JJ and Bagghi D, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biol Med* **18**: 321-336, 1995.
16. Kalyanaraman B, Characterization of o-semiquinone radicals in biological systems. *Met. Enzymol* **186**: 333-343, 1990.
17. Buettner GR, Activation of oxygen by metal complexes and its relevance to autoxidative processes in living systems. *Bioelectrochem Bionerg.* **18**: 29-36, 1987.
18. Hastings TG and Zigmond MJ, Identification of catechol-protein conjugates in neostriatal slice incubated with (3H) dopamine: Impact of ascorbic acid and glutathione. *J Neurochem* **63**: 1126-1132, 1994.
19. Sam E, Augustijns Pand Verbeke N, Stability of apomorphine in plasma and its determination by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chrom. Biomedical Applications* **658**: 311-317, 1994.
20. Nakayama T, Suppression of hydroperoxide-induced cytotoxicity by polyphenols. *Cancer Res* **54**: 1991S-1993S, 1994.

21. Singh V, Ahmad S and Rao GS, Proxidant and antioxidant properties of iron-hydroquinone and iron-1,2,4-benzenetriol complex. Implications for benzene toxicity. *Toxicology* **89**: 25-33, 1994.
22. Stadler RH, Markovic J and Turesky RJ, In vitro anti- and pro-oxidative effects of natural polyphenols. *Biol. Trace Element Res* **47**: 299-305, 1995.
23. Akai T, Ozawa M, Yamaguchi M, Mizuta E and Kuno S, Behavioral involvement of central dopamine D-1 and D-2 receptors in 1-methyl-4phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-lesioned parkinsonian cynomolgus monkeys. *Japanese J Pharmacol* **67**: 117-124, 1995.
24. Sengstock GJ, Olanow CW, Dunn AJ, Barone Sjr and Arendash GW, Progressive changes in striatal dopaminergic markers, nigral volume, and rotational behavior following iron infusion into the rat substantia nigra. *Experim. Neurol.* **130**: 82-94, 1994.
25. Silva DM and Aust SD, Ferritin and ceruloplasmin in oxidative damage: review and recent findings. *Can j Physiol Pharmacol* **71**: 715-720, 1993.
26. Monteiro HP and Winterbourn CC, *Biochem Pharmacol* **38**: 4177-4182, 1989.

## LEGENDS OF FIGURES

Figure 1.5. Kinetics of APO degradation. APO oxidative degradation was followed by measuring spectral changes of a 1.0 mM solution in PBS, monitoring the absorbance between 360-780 nm after increasing times at room temperature. The spectral changes were recorded with a DW 2000 dual-wavelength spectrophotometer (Aminco), immediately after addition of 10  $\mu$ l APO stock solution (100 mM in DMSO) to the cuvette containing 1.0 ml of PBS (line a) or after 5, 10, 15, 30 or 60 min dissolution (lines b, c, d, e and f, respectively).

Figure 2.5. Effect of iron on the kinetics of APO autoxidation. APO autoxidation was followed spectrophotometrically at 415 nm for 30 min, in a quartz cuvette containing 1.0 mM APO in PBS (pH 7.2) alone (O) or in the presence of FeCl<sub>3</sub> at final concentrations of 10  $\mu$ M ( $\square$ ), 25  $\mu$ M ( $\Delta$ ), or 50  $\mu$ M (+); spectrum of a 1.0 mM APO solution in phosphate buffer pH 5.0 ( $\oplus$ ).

Figure 3.5. Kinetics of oxygen consumption by APO. Rates of O<sub>2</sub> uptake by APO solutions were recorded using a Clark type electrode at 28 °C. Measurements were started by addition of APO to the glass chamber (indicated by the arrow) containing PBS (line a) plus FeCl<sub>3</sub> at final concentrations of 10, 25 and 50  $\mu$ M (lines b, c and d, respectively). In line b (arrow) represents the catalase effect (CAT; 250 U/ml) added after 15 min oxidation of APO.

Figure 4.5. Effect of iron on superoxide anion radical production during APO autoxidation. Superoxide radical was quantified through the reduction of NBT to formazan blue, followed at 560 nm. Assays were performed in PBS containing APO (0.5 or 1.0 mM), in the absence or presence of FeCl<sub>3</sub> (10 or 50 μM), as it is specified in the figure. Absorbance measurements were done after 2 hr incubation at room temperature.

Figure 5.5. Inhibition of cell proliferation by APO. Exponentially growing V79 fibroblasts were exposed (30 min, 37°C) to increasing APO concentrations in PBS alone (O) or containing 250 U/ml catalase (□). At the end of treatment cells were allowed to grow for an additional 24 h period, and then lysed with NaOH. Cell population enhancement was expressed as percent of lysated absorbance increased at 260 nm (A<sub>260</sub>), in relation to control assays. Values are averages from 3 distinct experiments performed in triplicate/dose.

Figure 6.5. Effect of iron in APO-induced inhibition of cell proliferation. Cell exposure to APO (50 μM) was performed as described in the legend of Fig. 5, in the absence or presence of FeCl<sub>3</sub> (10, 25 or 50 μM), as specified in the figure. The relative proliferation was determined as in Fig. 5.

Figure 7.5. Production of APO corresponding *o*-quinone by a mechanism involving semiquinone generation.

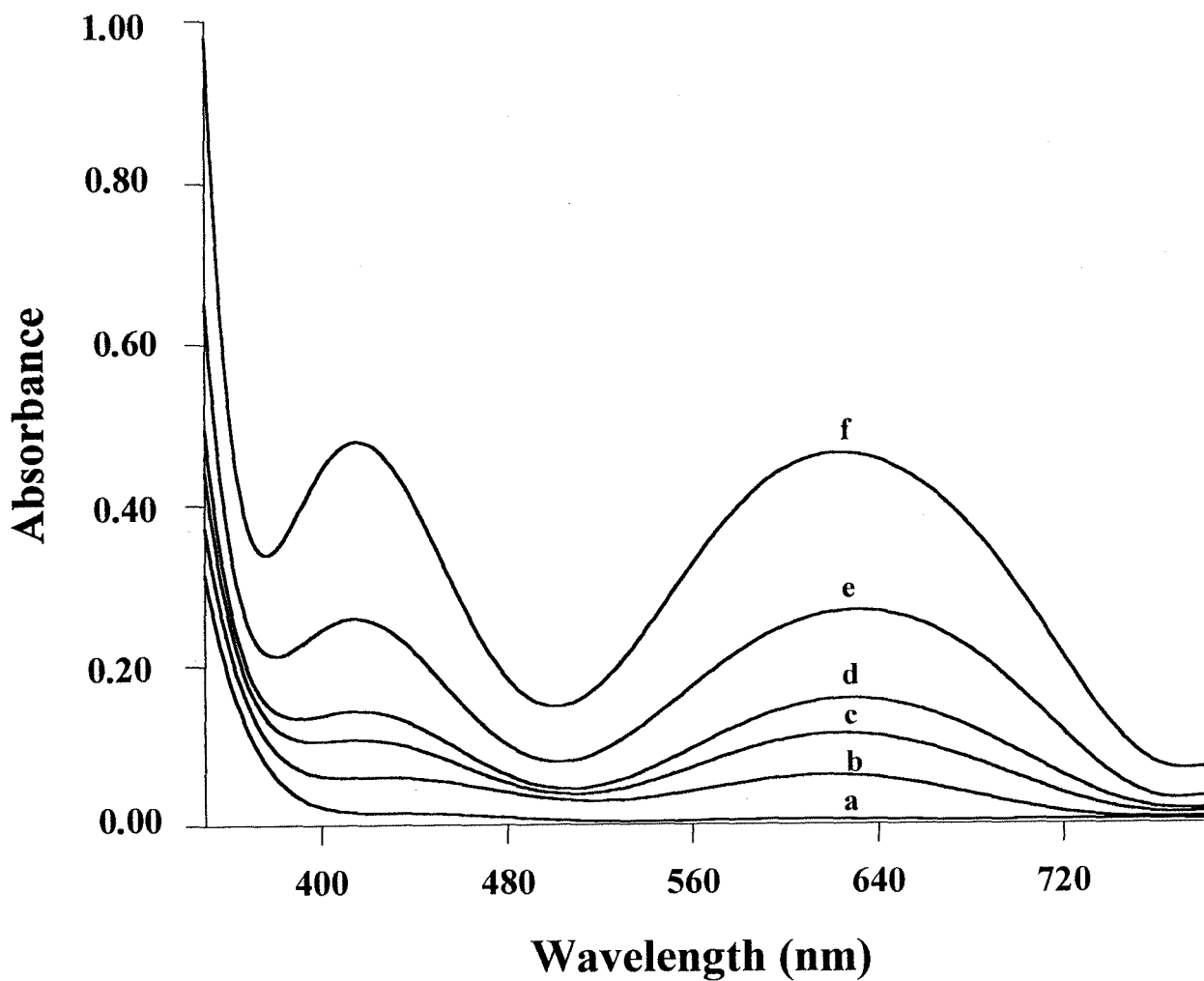


Figure 1.5. Kinetics of APO degradation. APO oxidative degradation was followed by measuring spectral changes of a 1.0 mM solution in PBS, monitoring the absorbance between 360-780 nm after increasing times at room temperature. The spectral changes were recorded with a DW 2000 dual-wavelength spectrophotometer (Aminco), immediately after addition of 10  $\mu$ l APO stock solution (100 mM in DMSO) to the cuvette containing 1.0 ml of PBS (line a) or after 5, 10, 15, 30 or 60 min dissolution (lines b, c, d, e and f, respectively).

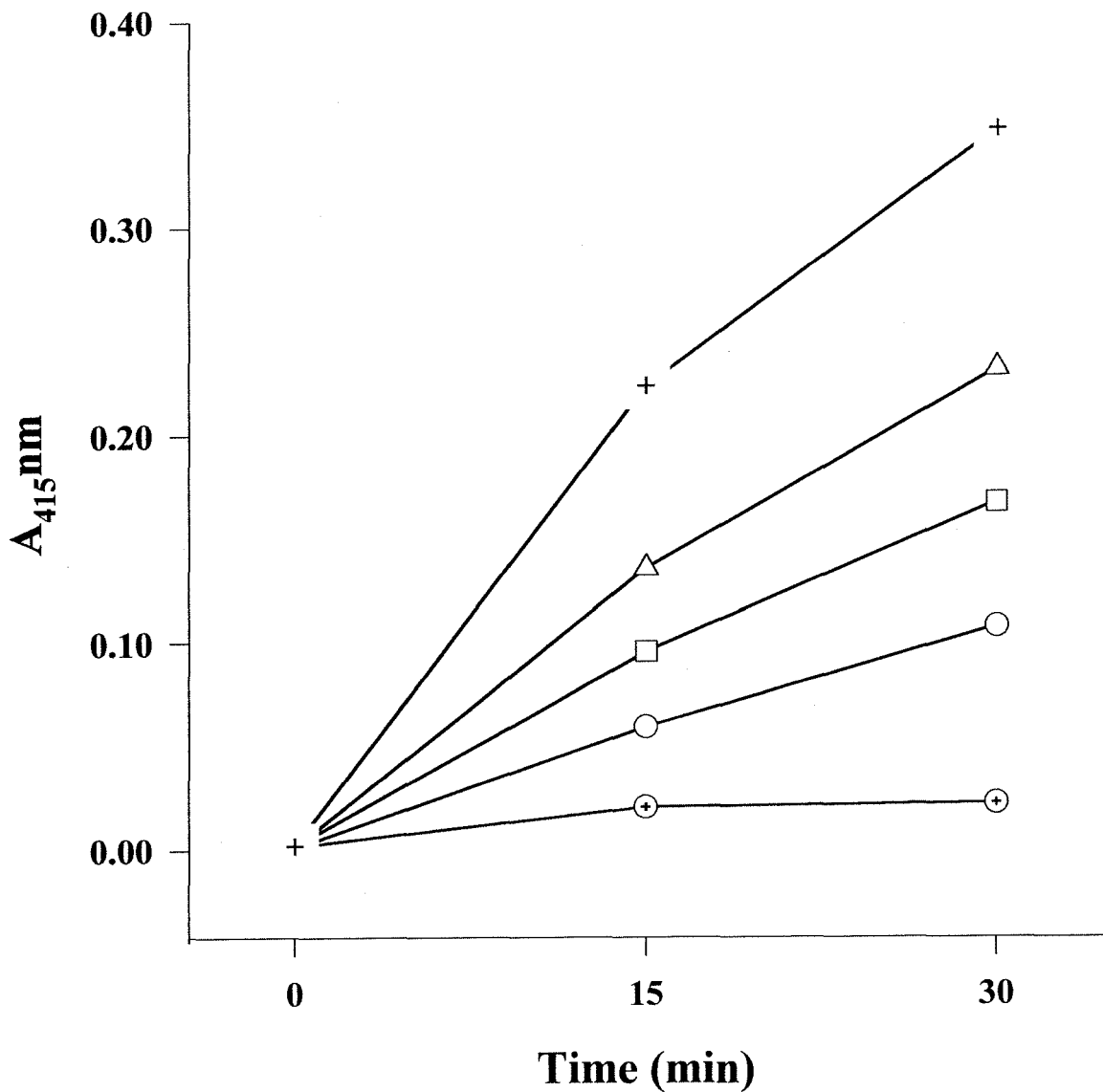


Figure 2.5. Effect of iron on the kinetics of APO autoxidation. APO autoxidation was followed spectrophotometrically at 415 nm for 30 min, in a quartz cuvette containing 1.0 mM APO in PBS (pH 7.2) alone (O) or in the presence of  $\text{FeCl}_3$  at final concentrations of 10  $\mu\text{M}$  ( $\square$ ), 25  $\mu\text{M}$  ( $\Delta$ ), or 50  $\mu\text{M}$  (+); spectrum of a 1.0 mM APO solution in phosphate buffer pH 5.0 ( $\oplus$ ).

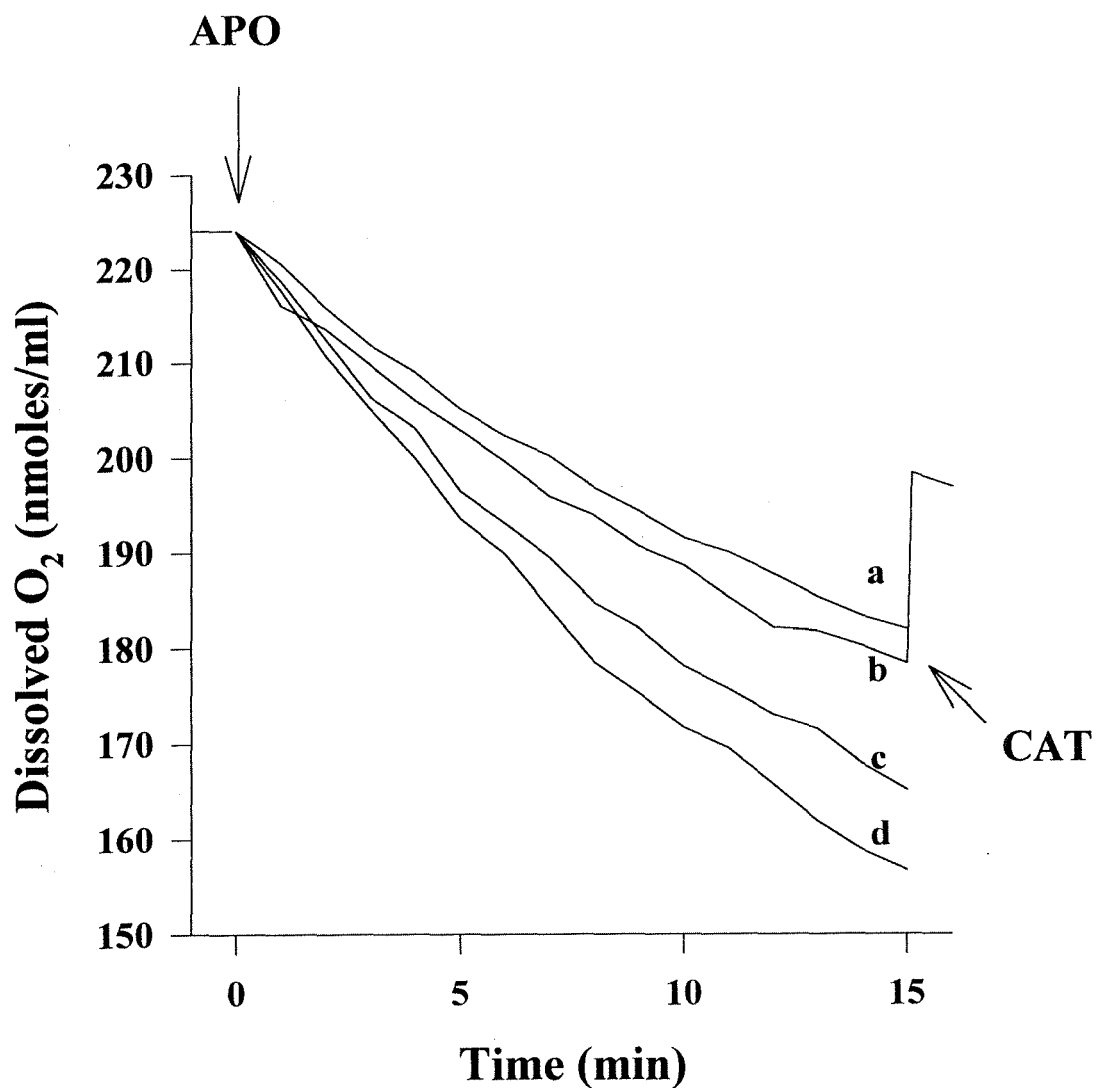


Figure 3.5. Kinetics of oxygen consumption by APO. Rates of O<sub>2</sub> uptake by APO solutions were recorded using a Clark type electrode at 28 °C. Measurements were started by addition of APO to the glass chamber (indicated by the arrow) containing PBS (line a) plus FeCl<sub>3</sub> at final concentrations of 10, 25 and 50 μM (lines b, c and d, respectively). In line b (arrow) represents the catalase effect (CAT; 250 U/ml) added after 15 min oxidation of APO.



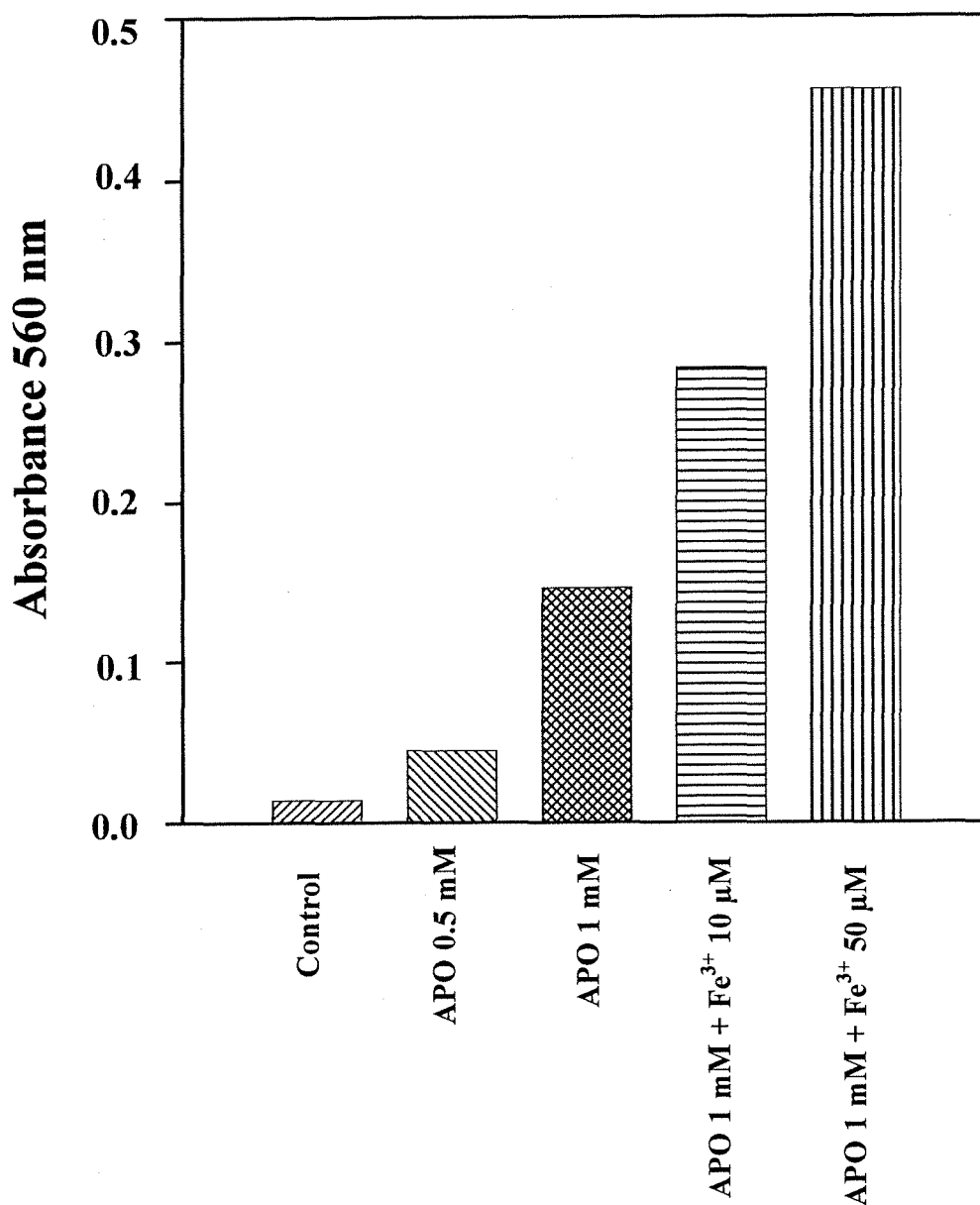


Figure 4.5. Effect of iron on superoxide anion radical production during APO autoxidation. Superoxide radical was quantified through the reduction of NBT to formazan blue, followed at 560 nm. Assays were performed in PBS containing APO (0.5 or 1.0 mM), in the absence or presence of FeCl<sub>3</sub> (10 or 50 μM), as it is specified in the figure. Absorbance measurements were done after 2 hr incubation at room temperature.

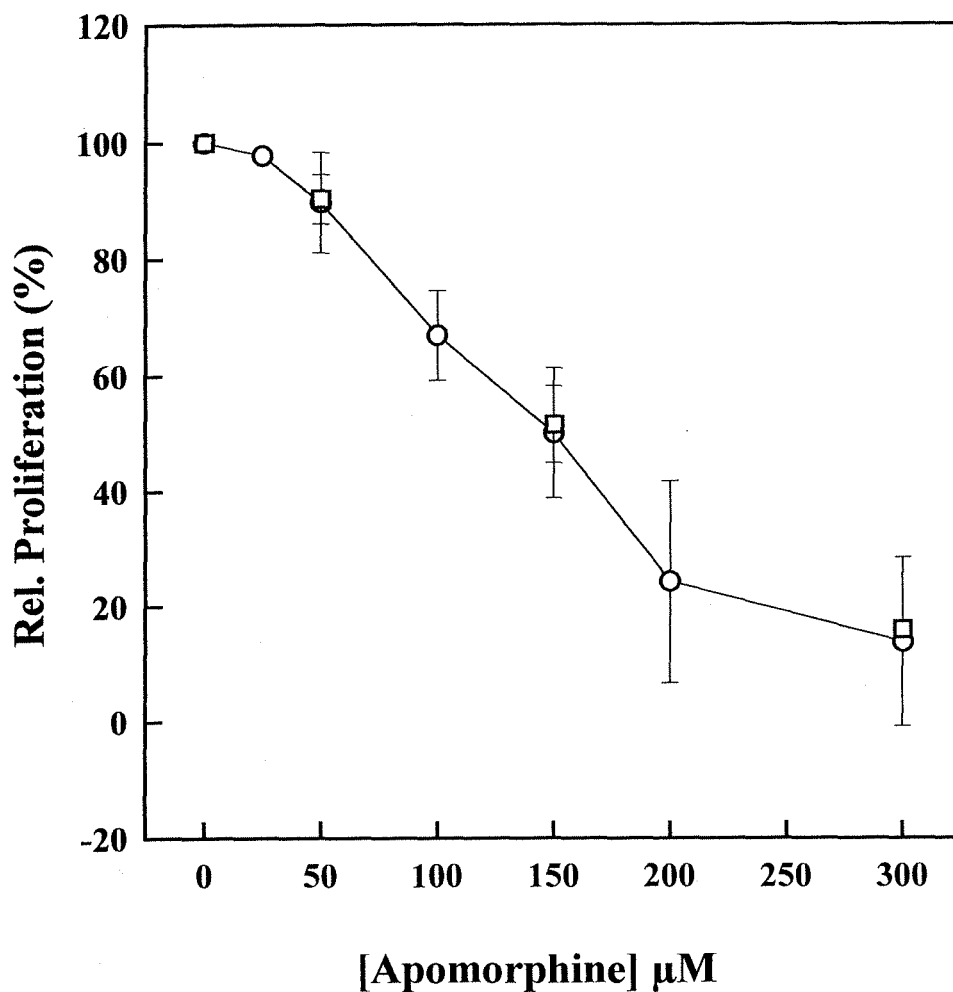


Figure 5.5. Inhibition of cell proliferation by APO. Exponentially growing V79 fibroblasts were exposed (30 min, 37°C) to increasing APO concentrations in PBS alone (O) or containing 250 U/ml catalase ( $\square$ ). At the end of treatment cells were allowed to grow for an additional 24 h period, and then lysed with NaOH. Cell population enhancement was expressed as percent of lysated absorbance increased at 260 nm ( $A_{260}$ ), in relation to control assays. Values are averages from 3 distinct experiments performed in triplicate/dose.

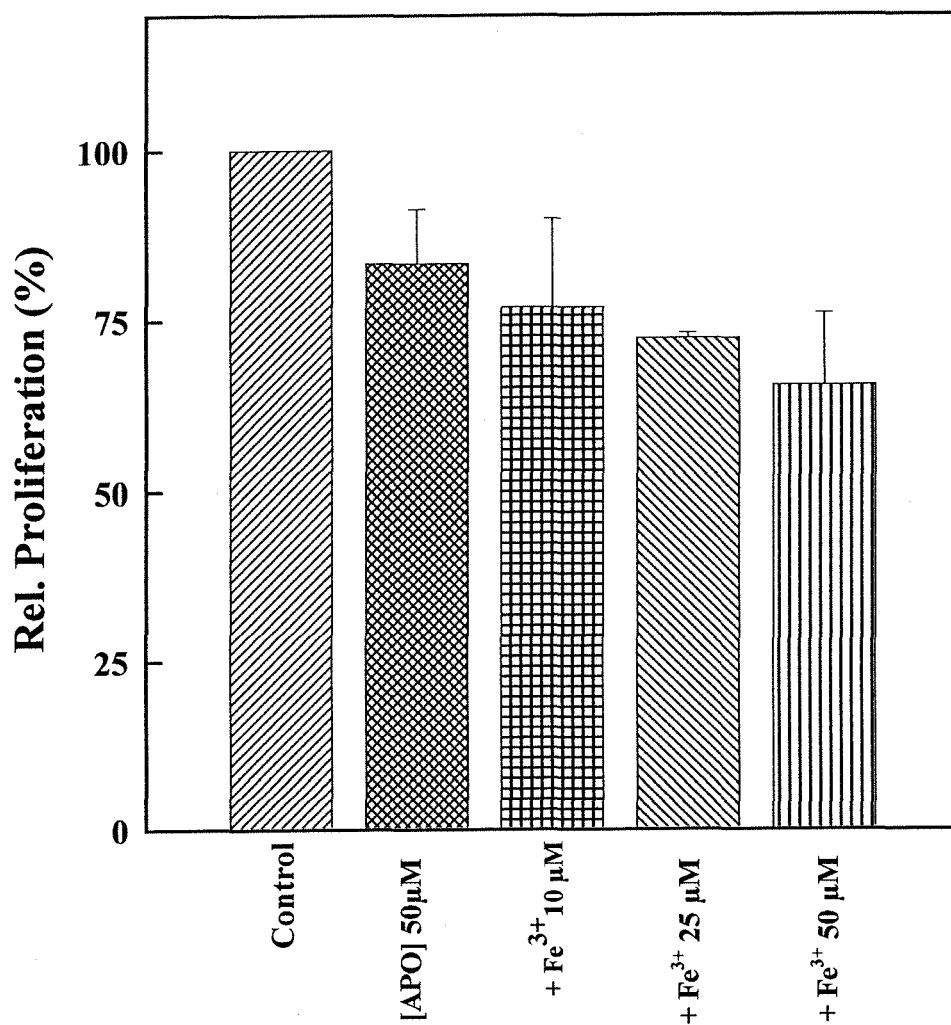


Figure 6.5. Effect of iron in APO-induced inhibition of cell proliferation. Cell exposure to APO (50 µM) was performed as described in the legend of Fig. 5, in the absence or presence of FeCl<sub>3</sub> (10, 25 or 50 µM), as specified in the figure. The relative proliferation was determined as in Fig. 5.

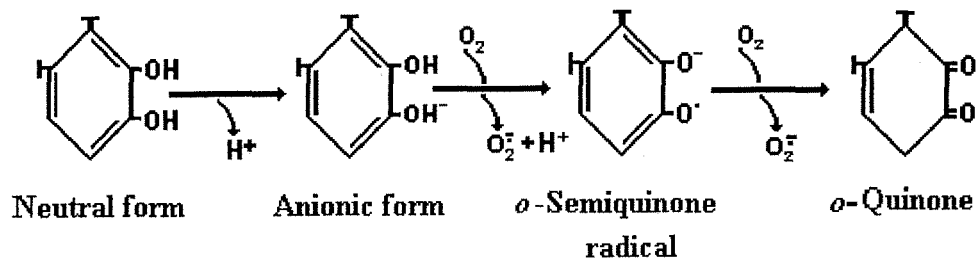


Figure 7.5. Production of APO corresponding *o*-quinone by a mechanism involving semiquinone generation.

## 6 - DISCUSSÃO GERAL

Os resultados obtidos com determinações espectrofotométricas juntamente, com dados da literatura, nos levam a concluir que o alcalóide benzilisoquinolínico apomorfina é uma substância instável, que sofre degradação química em presença de oxigênio molecular. Este processo de degradação é conhecido como autoxidação. Quimicamente, este alcalóide possui similaridade estrutural com a dopamina. Esta similaridade se deve às hidroxilas vicinais no anel D, formando um grupamento catecólico (CANNON *et al.*, 1972) (Figura 1.1). A oxidação da apomorfina ocorre através da perda de elétrons pertencentes a este grupamento catecólico. Este processo oxidativo está intimamente ligado ao pH do meio, pois é necessário que ocorra primeiramente a ionização da estrutura catecólica, para depois haver a transferência eletrônica (oxidação) (BERTINI *et al.*, 1981; KALYANARAMAN *et al.*, 1985). Portanto, o processo de autoxidação da apomorfina ocorre principalmente em pH neutro e levemente básico, pois em pH ácido este alcalóide adquire estabilidade devido a não dissociação das hidroxilas do grupamento catecólico. O que nos deixa dúvidas ainda, é saber quais os produtos que são formados durante este processo. É conhecido que catecóis e catecolaminas ao sofrerem autoxidação geram espécies reativas de oxigênio, radicais *o*-semiquinonas e quinonas. Em soluções fisiológicas, a dopamina, uma catecolamina endógena que desempenha importante função cerebral, pode ser

facilmente oxidada pelo oxigênio molecular, levando a sérias patologias do sistema nervoso central. Durante o processo oxidativo da dopamina, quinonas e radicais semiquinonas são gerados em reações em cadeia, o qual também resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (KLEGERIS *et al.*, 1995). Nossos estudos de titulação potenciométrica demonstraram que *in vitro* a apomorfina participa de transferências bieletrônicas com agentes oxidantes/redutores nos sugerindo que durante o processo oxidativo deste alcalóide neste sistema, não há a possibilidade de serem geradas espécies reativas de oxigênio. O principal produto de sua oxidação seria sua forma quinônica, e que esta estaria em equilíbrio com outras formas iônicas (Figura 1.6).

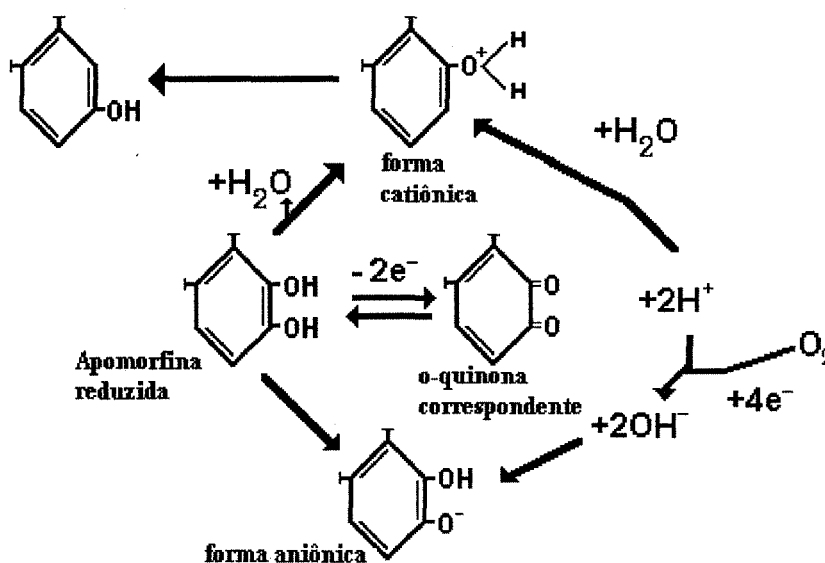


Figura 1.6. Modelo proposto para a oxidação da apomorfina *in vitro*. Representação do anel catecólico.

No final da década de sessenta e início da década de setenta LINDE & RAGAB (1968) e CAVA *et al.*, (1972) demonstraram a formação de uma *o*-quinona correspondente através de transferência bieletrônica em presença de agente oxidante bivalente. Os dados obtidos com a titulação potenciométrica, sugerindo a não formação de espécies reativas de oxigênio, durante o processo autoxidativo da apomorfina estão de acordo com os resultados verificados *in vivo* com o teste Salmonella/Microsoma (Teste de Ames). Neste experimento a apomorfina não foi capaz de induzir mutações na linhagem TA102 de *Salmonella typhimurium* em nenhuma das condições de tratamento empregadas. Esta linhagem é especialmente construída para detectar mutações induzidas por espécies reativas de oxigênio (MARON & AMES 1983). No entanto, em ausência de ativação metabólica, este alcalóide foi capaz de induzir mutações de defasagem no quadro de leitura (mutações frameshift) nas linhagens TA97 e TA98 (Figura 5.3). Este resultado é semelhante ao encontrado por SUTER & MATTER-JAGER em estudo realizado com apomorfina em 1984, onde os autores atribuem o efeito mutagênico desta substância aos produtos de sua autoxidação. Tanto no nosso estudo, quanto no trabalho de SUTER & MATTER-JAEGER (1984), não está claramente estabelecido quais produtos da autoxidação da apomorfina que seriam responsáveis pelos efeitos mutagênicos demonstrados em algumas linhagens de *Salmonella typhimurium*. A outra alternativa seria que a quinona e/ou semiquinona correspondente gerada após a oxidação deste alcalóide poderia ser a principal

responsável pelo efeito genotóxico da apomorfina. Em sistemas biológicos quinonas e semiquinonas podem se ligar covalentemente a proteínas, enzimas, espécies reativas de oxigênio secundárias entre outros produtos. A inativação de proteínas e/ou enzimas por quinonas é possivelmente devido à reações de adições nucleofílicas destas quinonas a grupamentos sulfidríla ou amino presentes nestas macromoléculas (para revisão, ver KALYANARAMAN *et al.*, 1985). Além disso, quinonas podem ainda ser tóxicas às células por vários mecanismos, incluindo participação em reações de ciclo redox, arilações, intercalções e induções de quebras no DNA, bem como interferência na respiração celular (MONKS *et al.*, 1992).

Em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* a apomorfina demonstrou ser citotóxica, sendo que esta citotoxicidade foi dependente da fase de crescimento. Em fase estacionária de crescimento, foi observada uma maior tolerância aos efeitos letais deste alcalóide. Nesta fase de crescimento, onde os níveis de glicose não ultrapassam 0,2%, estes microorganismos realizam principalmente metabolismo oxidativo (respiração). Por este motivo, existe uma adaptação bioquímica, onde várias enzimas que estavam reprimidas pela glicose durante o metabolismo fermentativo, estão agora desreprimidas (GANCEDO & SERRANO, 1989; ENTIAN & BARNETT, 1992). Esta desrepressão catabólica também é válida para defesas antioxidantes, tais como catalases, superóxido dismutases, glutaciona



peroxidase e citocromo *c* peroxidase (KREMS *et al.*, 1995; MORADAS-FERREIRA *et al.*, 1996). Nossos resultados sugerem que nesta fase de crescimento as leveduras estariam com defesas antioxidantes suficiente para diminuir ou até suprimir os efeitos citotóxicos e genotóxicos da apomorfina (Tabelas 1.4 e 2.4). O aumento de defesas antioxidantes após a adaptação metabólica para a respiração é provavelmente um dos fatores que pode contribuir para o aumento da tolerância ao estresse oxidativo demonstrado por leveduras em fase estacionária de crescimento (JAMIESON *et al.*, 1994; MORADAS-FERREIRA, 1996). Também foi dependente de fase de crescimento os efeitos mutagênicos (frameshift) e recombinogênicos (crossing over) induzidos pela apomorfina em linhagens haplóides e diplóides de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente. Estes efeitos genotóxicos são convergentes e sugerem que os produtos da autoxidação da apomorfina, provavelmente sua quinona correspondente ou espécies reativas de oxigênio secundárias, poderiam interagir com DNA, resultando em quebras de cadeia simples e dupla desta molécula. A interação de algumas substâncias com o DNA, bem como espécies reativas de oxigênio, pode gerar quebras de cadeia simples e dupla no DNA (HALLIWEL & ARUOMA, 1991). A deficiência de defesas antioxidantes, bem como a facilidade de acesso de moléculas eletrofílicas ao DNA, induzindo quebras, poderiam ser fatores contribuintes para os efeitos citotóxicos e genotóxicos mais pronunciados em células em fase exponencial de crescimento.

Neste trabalho também foi analisado o envolvimento de metais de transição no mecanismo de autooxidação e ação tóxica da apomorfina. É conhecido que metais de transição em concentrações fisiológicas, podem catalisar a oxidação de muitas biomoléculas *in vivo*, tais como dopamina, adrenalina, glutathiona entre outras. Durante o processo de oxidação catalisada por metais de transição, pode ocorrer a produção de espécies reativas de oxigênio (MILLER *et al.*, 1990). Portanto, o processo de oxidação da apomorfina *in vivo* pode ser influenciado pela presença de metais de transição existentes normalmente em sistemas biológicos; e neste caso, não está completamente descartada a possibilidade de não formação de espécies reativas de oxigênio. Os resultados obtidos com experimento de proliferação com fibroblastos de pulmão de hamster chinês (células V79) reforçam a idéia da pequena quantidade de espécies reativas de oxigênio geradas durante a oxidação da apomorfina e o envolvimento de metais de transição neste processo. Experimentos preliminares realizados em oxígrafo para verificar o consumo de oxigênio ( $O_2$ ), revelaram que este consumo durante a oxidação da apomorfina é bastante lento (Figura 3.5). Além disso se verificou, que após consumida certa quantidade de  $O_2$ , a adição de catalase não restaura a quantidade de  $O_2$  já consumida. Isto significa que houve pouca produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), durante a oxidação da apomorfina. Este resultado é consistente com o fato da catalase não oferecer proteção às células V79 quando submetidas ao tratamento

com apomorfina. Nossos resultados também demonstram o envolvimento de ferro no mecanismo da ação tóxica da apomorfina. Este metal de transição potencializou o efeito inibitório de proliferação celular causado pela apomorfina (Figura 4.5). Em recente trabalho, NEWCOMER e colaboradores (1995) demonstraram que o ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) catalisa a oxidação de DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina) aumentando significativamente a formação da quinona correspondente. Este processo, poderia estar correlacionado com o desenvolvimento de patologias neurodegenerativas. No caso da apomorfina, o  $\text{Fe}^{3+}$  poderia potencializar a autooxidação da apomorfina, conseqüentemente aumentando a velocidade de formação de sua quinona correspondente, que poderia ser refletida pelo aumento da inibição de proliferação de células V79 (Figura 6.5).

## 7 - CONCLUSÕES

Em resumo, os resultados obtidos com esta investigação sobre os vários aspectos que podem influenciar na citotoxicidade da apomorfina nos levam as seguintes conclusões:

1 - *In vitro* a apomorfina pode sofrer oxidação em presença de agentes oxidante, tais como oxigênio molecular e dicromato de potássio, envolvendo transferências preferencialmente bieletrônicas. Em presença de metais de

transição ( $\text{Fe}^{3+}$ ) o processo de oxidação pode ocorrer através de transferências monoelétrônicas.

2 - Os efeitos citóxicos, genotóxicos, bem como de inibição da proliferação celular induzidos por este alcalóide analisados em sistema procarioto, eucarioto inferior e células de mamíferos sugere forte dependência de processo oxidativo. Como consequência deste processo oxidativo, estaria a formação de quinonas e semiquinonas que poderiam ser as principais responsáveis por esta toxicidade da APO nos diferentes sistemas teste.

3 - Vários fatores podem influenciar a toxicidade da apomorfina em sistemas biológicos, sendo que esta influência está ligada com interferências nos processos oxidativos da APO ou nas defesas antioxidantes das células. Estes fatores incluem: (a) presença de substâncias que podem prevenir a autooxidação da APO *in vivo*, como observado nos ensaios com bactérias em presença de metabolização e ensaios com leveduras em presença de GSH; (b) níveis de defesas antioxidantes como verificado com ensaios com leveduras realizados em diferentes fases de crescimento, e, (c) presença de metais de transição encontrados fisiologicamente nas células, como analisado com experimentos de proliferação celular em células V79.

## 8 - PERSPECTIVAS

Seria de grande valia o aprofundamento do conhecimento dos mecanismos de oxidação e ação tóxica da APO em diversos sistemas biológicos, visto que esta droga apresenta grande potencial farmacológico no tratamento do mal de Parkinson. Portanto, para compreender melhor os mecanismos de oxidação e ação tóxica deste alcalóide é necessário a continuidade deste trabalho. Para verificar quais produtos são formados durante o processo de autooxidação deste alcalóide poderiam ser realizados experimentos de caracterização de espécies reativas de oxigênio e radicais *o*-semiquinona em sistemas biológicos. É bem conhecido que estes radicais são produtos intermediários formados durante a autooxidação e oxidação enzimática de catecóis e catecolaminas. Mesmo que a produção destas espécies seja pequena, a detecção através de ESR (ressonância de spins de elétrons) parece ser bem indicado (KALYANARAMAN, 1990). Além disso, é possível também detectar compostos quinóides em sistemas biológicos através cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Uma vez que quinonas e hidroquinonas podem ser oxidadas e reduzidas eletroquimicamente, é bastante apropriada a detecção e quantificação destas moléculas utilizando-se este tipo de cromatografia com detector eletroquímico. A outra vantagem, é a sensibilidade do método, pois esta técnica é capaz de detectar e quantificar compostos quinóides

em sistemas biológicos em concentrações na ordem de picomoles (CADENAS & ERNSTER, 1990).

Sob o ponto de vista das defesas antioxidantes, um estudo a nível bioquímico e molecular poderia ser realizado. Há evidências que catecóis e algumas catecolaminas sofram oxidação enzimática, produzindo quinonas, semiquinonas e possivelmente EROs. E também é possível que enzimaticamente estas quinonas sejam novamente reduzidas, participando do processo chamado ciclo redox (WEFERS & SIES, 1983). A determinação da atividades de algumas enzimas que poderiam participar deste processo metabólico, poderia fornecer informações sobre alguns mecanismos de detoxificação, bem como sobre produtos gerados durante a autooxidação da apomorfina. Desta forma, seria possível estabelecer uma provável situação de estresse ocorrido nas células após o tratamento com APO. Seguindo esta mesma linha, estudos de indução de genes envolvidos em proteção a vários tipos de estresse poderiam também colaborar para o esclarecimento dos mecanismos de ação tóxica da apomorfina. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* representa um sistema ideal para estudos de regulação de expressão gênica em resposta ao estresse oxidativo. Utilizando-se um sistema similar ao descrito por JAMIESON e colaboradores (1994), onde plasmídeos construídos com promotores da catalase e superóxido dismutase (SOD) fusionados com o gene *lacZ* de *Escherichia coli* indicariam o nível de expressão

destes respectivos genes em leveduras. Desta forma poderíamos analisar as enzimas induzidas por um provável estresse oxidativo provocado pelo tratamento com APO.

## 9 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, M.S.; FAZAL, F.; RAHMAN, A.; HADI, S.M & PARISH, J.H. (1992) Activities of flavonoids for the cleavage of DNA in presence of Cu(II): correlation of active oxygen species. *Carcinogenesis*, **13**:605-608.
- AMES, B.N. (1989) Mutagenesis and carcinogenesis: endogenous and exogenous factors. *Enviromn. Mol. Mut.*,(S)**16**:66-77.
- AMES, B.N.; LEE, F.D. & DURSTON, W.E. (1973) An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **70**:782-786.
- ASHBY, J. & TENNANT, R.W. (1988) Chemical structure *Salmonella* mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodent by U.S. NCI/NTP. *Mut. Res.*, **204**:17-115.
- BERTINI, I.; LUNAZZI, L. & DEI, A. (1981) *Advances in Solution Chemistry*. Plenum Press, New York, 387p.
- BUECHTER, D.D. (1988) Free radicals and oxygen toxicity. *Pharmacol. Res.* **5**:253-260.
- VON BORSTEL, R.C.; CAIN, K.T. & STEIBERG, C.M. (1971) Inheritance of spontaneous mutability in yeast. *Genetics*, **69**:17-27.
- CADENAS, E. & ERNSTER, L. (1990) Quinoids compounds: high-performance liquid chromatography with eletrochemical detection *Met. Enzimol.*, **186**:180-196.
- CANNON, J.G.; KIM, J.C.; ALBEM, M.A. & LONG, J.P. (1972) Centrally acting emetics. 6. Derivatives of  $\beta$ -naphthylamine and 2-indanamine. *J. Med. Chem.*, **15**:348-350.
- CASSELS, B.K.; ASENCIO, M.; CONGET, P.; SPEISKY, L. A. V. & LISSI, E. A. (1995) Structure-antioxidative activity relationships in benzyloquinoline alkaloids. *Pharmacol. Res.*, **31**:103-107.
- CAVA, M.P.; VENKATESWARLU, A.; SRINIVASAN, M. & EDIE, D.L. (1972) Oxidative transformations in the aporphine alkaloids series. *Tetrahedron*, **28**:4299-4307.



- CHENG, L.; WATT, R. & PIPER, P.W. (1994) Polyubiquitin gene expression contributes to oxidative stress resistance in respiratory yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Mol. Gen. Genet.*, **243**:358-362.
- CHRISTOPHERSEN, B.O. (1969) Formation of monohydroxy-polyenic fatty acids from lipid peroxides by glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta.* **176**:463-467.
- CLAYSON, D.B. & ARNOLD, D.L. (1991) The classification of carcinogenesis identified in the rodent bioassay as potential risks to humans: What type of substance should be tested next? ICPEMC. *Mut. Res.*, **257**:91-106.
- COSTA, V.; REIS, E.; QUINTANILHA, A. & MORADAS-FERREIRA, P. (1993) Aquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the key role of the mitochondrial superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**:608-614.
- CURNUTTE, J.T. & BABIOR, B.M. (1987) Chronic granulomatous disease. *Adv. Hum. Genet.* **16**:229-245.
- DAVIES, K.J.A. (1994) Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.*, **61**:1-31.
- ENTIAN, K.D. & BARNETT, J.A. (1992) Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *TIBS*, **10**:506-510.
- FARBER, J.L.; KYLE, M.E. & COLEMAN (1990) Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab. Invest.* **62**:670-678.
- FRIDOVICH, I. (1983) Superoxide radical, an endogenous toxicant *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23**:239-257.
- FRAENKEL, D.G. (1982) Carbohydrate metabolism. In: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae: Metabolism and Gene Expression*. STRATHERN, J.N.; JONES, E.W. & BROACH, J.R. (eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p.1-37.
- GANCHER, S.T. (1995) Dopamine agonists under investigation including apomorphine. In: KOLLER, W.C. & PAULSON, G. (eds) *Therapy of Parkinson s disease*. 2ed. Marcel Decker, inc. New York. p.273-286.
- GANCEDO, C. & SERRANO, R. (1989) Energy-yielding metabolism. In: HARRISON, J.S. & ROSE, A.H. (eds.) *The yeast.*, vol.3, Academic Press, New York. p.205-259.
- GARCÍA-RUIZ, C.; COLELL, A.; MORALES, A.; KAPLOWITZ, N. & FERNÁNDEZ-CHECA. (1995) Role of oxidative stress generated from mitochondrial

electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol. Pharmacol.*, **48**:825-834.

GARRET, R.H. & GRISHAM, C.M. (1995) *Biochemistry*. 1100 p. Saunders & Harcourt Brace, Orlando.

GILMANN, A. G.; RALL T.W.; NIES, A.S. & TAYLOR, P. (1991). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 8 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1232p.

GRAHAM, D.G. (1978). Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelani and cytotoxic quinones. *Mol. Pharmacol.*, **14**:633-643.

HALLIWELL, B. (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Amer. J. Med.* **91**(sup 3c):14s-22s.

HALLIWELL, B. & ARUOMA, O.I. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanisms and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* **281**:9-19.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C.(1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**: 1-14.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C.(1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2ed., Oxford University Press, Oxford.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth. Enzimol.*, **186**:1-85.

HASTINGS, T. & ZIGMOND, M.J. (1994) Identification of catechol-protein conjugates in neostriatal slices incubated with [ $^3$ H]dopamine: impact of ascorbic acid and glutathione. *J. Neurochem.* **63**:1126-1132.

HENRIQUES, J.A.P.; VALSA, J. DE O. & GOMES, R.A. (1987) Utilização de testes com microrganismos para detecção de atividades mutagênicas e (ou) potencialmente oncogênicas. In: PINTO, S.O. DA C. (ed.). *Genética Molecular de Microrganismos*. Manole, São Paulo.

HOLEMBERG, P. (1984) The physics and the chemistry of free radicals. *Med. Biol.* **62**:68-70.

HURREL, R.F & FINOT, P.A. (1984) Nutricional consequences of the reactions between proteins and oxidized polyphenolic acid. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **177**:423-435.

- ISHII, T. & FRIDOVICH, I. (1990) Dual effects of superoxide dismutase on the autoxidation of 1,4-naphthohydroquinone. *Free Rad. Biol. Med.*, **8**:21-24.
- JAMESION, D.J.; RIVERS, S.L. & STEPHEN, D.W.S. (1994) Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology*, **140**:3277-3283.
- KALYANARAMAN, B. (1990) Characterization of *o*-semiquinone in biological systems. *Meth. Enzimol.* **186**:333-343.
- KALYANARAMAN, B.; FELIX, C.C. & SEALY, R.C. (1985) Semiquinone anion radicals of catechol(amine)s, catechol estrogens and their metal ion complexes. *Environm. Health Perspec.* **64**:185-198.
- KAPPUS, H. (1986) Overview of enzyme systems involved in bio-reduction of drugs and in redox cycling. *Biochem. Pharmacol.*, **35**:1-6.
- KAPPUS, H. (1987) Oxidative stress in chemical toxicity. *Arch. Toxicol.* **60**:144-149.
- KAPPUS, H. & SIES, H. (1981) Toxic drug effects associated with oxygen metabolism:redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia* **37**:1233-1241.
- KEELING, P.L. & SMITH, L.L. (1982) Relevance of NADPH depletion and mixed disulphite formation in rat lung to the mechanism of cell damage following paraquat administration. *Biochem. Pharmacol.* **31**:3243-3249.
- KIRKLAND, D.J.; GALLOWAY, S.M. & SOFUNI, T. (1994) Summary of major conclusions. *Mut. Res.*, **312**:205-209.
- KLEGERIS, A.; KORKINA, L.G. & GREENFIELD, S.A. (1995) Autoxidation of dopamine: a comparison of luminescent and spectrophotometric detection in basic solutions. *Free Rad. Biol. Med.* **18**:215-222.
- KREMS, B.; CHARIZANIS, C. & ENTIAN, K.D (1995) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* sensitive to oxidative and osmotic stress. *Curr. Genet.*, **27**:427-434.
- LAGUNAS, R. (1986) Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **2**:221-228.
- LEMONT, J.F. (1977) Pathways of ultraviolet mutability of *Saccharomyces cerevisiae*. IV. The relation between canavanine toxicity and ultraviolet mutability to canavanine resistance. *Mut. Res.*, **43**:339-355.
- LEWIS, J.G.; NORTHCOTT, C.J.; LEARMONTH, R.P.; ATTFIELD, P.V. & WATSON, K. (1993) The need for consistent nomenclature and assesment

- of growth phases in diauxic cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, **139**:835-839.
- LI, Y & TRUSH, M. (1994) Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res.* **54**(suppl.):1895s-1898s.
- LI, Y.; TRUSH, M. & YAGER, J.D. (1994) DNA damage caused by reactive oxygen species originating from a copper-dependent oxidation of the 2-hydroxy catechol of estradiol. *Carcinogenesis*, **15**:1421-1424.
- LIEHR, J & ROY, D. (1990) Free radical generation by redox cycling of estrogens. *Free Rad. Biol. Med.*, **8**:415-423.
- LINDE, H.H.A. & RAGAB, M.S. (1968) Die autoxydation des apomorphins. *Helv. Chim. Acta*, **51**:683-687.
- LITTLE, C. & O'BRIEN, P.J. (1968) An intracellular GSH-peroxidase with a lipid peroxide substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**:145-150.
- LOHMAN, P.H.M.; MENDELSON, M.L.; MORE II, D.H.; WATERS, M.D.; BRUSICK, D.J.; ASHBY, J & LOHMAN, W.J.A. (1992). A method for comparing and combining short-term genotoxicity test data: The basic system. *Mut. Res.*, **266**:7-25.
- MARON, D.M. & AMES, B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mut. Res.*, **113**:173-215.
- MARTINEZ, L.A.; RÍOS, J.L.; PAYA, M. & ALCARAZ, M.J. (1992) Inhibition of nonenzymic lipid peroxidation by benzylisoquinoline alkaloids. *Free Rad. Biol. Med.*, **12**:287-292.
- MASON, H.S. & PETERSON, E.W. (1965) Melanoproteins. 1. Reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **111**:134-146.
- MASON, R.P. (1990) Redox cycling of radical anion metabolites of toxic chemicals and drugs and the Marcus theory of electron transfer. *Environm. Health Perspect.*, **87**:237-243.
- MCCORD, J.M. & FRIDOVICH, I. (1969) Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**:6049-6055.
- MCKENZIE, G.M. & WHITE, H. L. (1973) Evidence for the methylation of apomorphine by catechol-*o*-methyl-transferase *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Pharmacol.*, **22**:2329-2336.

- MILLER, D.M.; GARRY, R.B. & AUST, S. (1990) Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Rad. Biol. Med.*, **8**:95-108.
- MONKS, T.J.; HANZLINK, R.; COHEN, G.M.; ROSS, D. & GRAHAM, D. (1992) Contemporary issues in toxicology. Quinone chemistry and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **112**:2-16.
- MORADAS-FERREIRA, P.; COSTA, V.; PIPER, P. & MAGER, W. (1996) The molecular defenses against reactive oxygen species in yeast. *Mol. Microbiol.*, **19**:651-658.
- MORELLO, A.; LIPCHENCA, I.; CASSELS B.K.; SPIESKY, H.; ADUNATE, J. & REPETTO, Y. (1994) Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **107C**:367-371.
- MOUSTACCHI, E. (1980) Mutagenicity testing with eukaryotic microorganisms. *Arch. Toxicol.*, **46**:99-110.
- NEUMEYER, J.L. (1985) Synthesis and structure-activity relationships of aporphines as dopamine receptor agonists and antagonists. In: *Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 146-170pp.
- NEWCOMER, T.A.; ROSENBERG, P.A. & AIZENMAN, E. (1995) Iron-mediate oxidation of dihydroxyphenylalanine to an excitocin. *J. Neurochem.* **64**:1742-1748.
- OHTA, T.; NAKAMURA, N.; MORIYA, M.; SHIRASU, Y. & KADA, T. (1984) The SOS-function-inducing activity of chemical mutagens in *Escherichia coli*. *Mut. Res.*, **131**:101-109.
- RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.; LA, R. & MONTELEONE NETO, R. (1991) *Muatgênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação*. Sociedade Brasileira de Genética - Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. 246p.
- REED, D.J. (1986) Regulation of reductive processes by glutathione. *Biochem. Pharmacol.* **35**:7-13.
- RÍOS, J.L.; SIMEÓN, S. & VILLAR, A. (1989) Pharmacological activity of aporphinoid alkaloids. A review. *Fitoterapia*, **60**:387-412.

- SAM, E.; AUGUSTIJNS, P. & VERBEKE, N. (1994) Stability of apomorphine in plasma and its determination by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chrom. B*, **658**:311-317.
- SHAMA, M. (1972) *The Isoquinoline Alkaloids. The Chemistry and Pharmacology*. Academic Press, New York.
- SIES, H. (1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **25**:1058-1071.
- SIES, H. (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* **215**:213-219.
- SIES, H.; STHAL, W. & SUNDQUIST, A.R. (1992) Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene and other carotenoids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **669**:7-20.
- SOUTHORN, P.A. & POWIS, G. (1988) Free radicals in medicine: chemical nature and biological reactions *Mayo Clin. Proc.* **63**:381-389.
- SUTER, W. & MATTER-JAEGER, I. (1984) Genotoxicity of apomorphine and various catecholamines in the Salmonella mutagenicity (Ames test) and in tests for primary DNA damage using repair-deficient *B. subtilis* strains (Rec assay). *Mut. Res.*, **137**:17-28.
- SWIERENGA, S.H.H.; HEDDLE, J.A.; SIGAL, E.A.; GILMAN, J.P.W., BRILLINGER, R.L.; DOUGLAS, G.R. & NESTMANN, E.R. (1991) Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories, IV. Chromosome aberration and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. *Mut. Res.*, **246**:301-322.
- TENENBAUM, L. & MALAVEILLE, C. (1988) Quantification of genotoxic effects of alkylating agents in bacterial assays. *Mutagenesis*, **4**:317-322.
- TRUSH, M.A.; MIMNAUGH, E.G. & GRAM, T.E. (1982) Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem. Pharmacol.* **31**:3335-3346.
- UBEDA, A.; MONTESINOS, C.; PAYA, M. & ALCARAZ, M. (1993) Iron-reducing and free-radical scavenging properties of apomorphine and some related benzylisoquinoline. *Free Radic. Biol. Med.*, **15**:159-167.
- WANDERS, R.J.A. & DENIS, D. (1992) Identification of superoxide dismutase in rat liver peroxisomes. *Biochem. Biophys. Acta* **1115**:259-262.

- WARDMAN, P.; DENNIS, M.F.; EVERETT, S.A.; PATEL, K.B.; STRATFORD, M.R.L. & TRACY, M. (1995) Radical from one-electron reduction of nitrocompounds, aromatic *N*-oxides and quinones: the kinetics base for hypoxia-selective, bioreductive drugs. *Biochem. Soc. Symp.*, **61**:171-194.
- WEFERS, H & SIES, H. (1983) Hepatic low-level chemiluminescence during redox cycling of menadione and the menedione-glutathion4 conjugate: relation to glutathione and NAD(P)H quinone reductase (DT-diaphorase). *Arch. Biochem. Biophys.* **224**:568-578.
- WEISBURGER, E.K. (1975) A critical evaluation of the methods used for determining carcinogenicity. *J. Clin. Pharmacol.*, **15**:5-15.
- WEUSTHUIS, R.A.; VISSER, W.; PRONK, J.T.; SCHEFFERS, W.A. & VAN DIJKEN, J.P. (1994) Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluyver effect. *Microbiology*, **140**:703:715.
- WILSON, A.P. (1986) Cytotoxicity and viability assays. In: FRESHNEY, R.I. *Animal Cell Culture: A Pratical Approach*. p183-216.
- ZHANG, Y.; MARCILLAT, O.; GIULIVI, C.; ERNSTER, L. & DAVIES, K.J.A. (1990) The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J. Biol. Chem.*, **265**:16330-16336.
- ZIEGER, E. (1987) Carcinogenicity of mutagens: predictive capability of the *Salmonella* mutagenesis assay for rodent carcinogenicity. *Cancer Res.*, **47**:1287-1296.
- ZIMMERMANN, F.K. (1984) Basic Principles and methods of genotoxicity testing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Handbook of Mutagenicity*. 2ed, Elsevier Science Publishers, Amsterdan. p.215-238.
- ZIMMERMANN, F.K.; KERN, R. & RASENBERG, H. (1975) A yeast strain for simultaneous detection of induced mitotic crossing-over, mitotic gene conversion and reverse mutation. *Mut. Res.*, **28**:381-388.
- ZIMMERMANN, F.K.; VON BORSTEL, R.C.; VON HALLE, E.S.; PARRY, J.M.; SIEBERT, D.; ZEITERBERG, G.; BARLE, R. & LOPRIENO, H. (1984) Testing of chemical for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*: a report of the US Environmental protection Agency Gene-Tox Program. *Mut. Res.*, **104**:87-94.

## 10 - RESUMO

Apomorfina é um alcalóide benzilisoquinolínico obtido a partir da morfina, através de reação catalisada por ácido clorídrico concentrado. Conhecido desde de 1869, este alcalóide foi utilizado inicialmente devido às suas propriedades eméticas. Atualmente, esta droga tem recebido atenção devido a sua similaridade estrutural com a dopamina e consequente efeito dopamimérgico, sendo considerado um importante agente no tratamento do mal de Parkinson. Seu uso farmacológico é limitado, pois apresenta grande instabilidade em fluídos biológicos. Esta instabilidade é provavelmente devido a oxidação do seu grupamento catecólico. Como já relatado para outras catecolaminas, como por exemplo a dopamina, estas substâncias são facilmente oxidadas em presença de oxigênio molecular ( $O_2$ ). É postulado que algumas doenças degenerativas do sistema central estão associadas à autooxidação de catecolaminas. Durante o processo de autooxidação das catecolaminas podem ser geradas espécies reativas de oxigênio, bem como outras espécies químicas igualmente reativas. A toxicidade da apomorfina foi avaliada em três diferentes sistemas biológicos e correlacionada com seu processo autoxidativo. Os estudos espectrofotométricos demonstraram que apomorfina sofre decomposição em função do tempo, sendo que esta decomposição é potencializada pela presença de ferro. Na ausência de íons metálicos, a autooxidação da apomorfina ocorre lentamente. Através de estudos potenciométricos, verificou-se que apomorfina possui um forte poder redutor, podendo realizar transferências bieletrônicas para agentes oxidantes. Em



sistemas biológicos não foi claramente estabelecido se apomorfina realiza transferências bieletrônicas, monoelétrônicas ou ambas. Independente do tipo de transferência, este alcalóide demonstrou efeitos citotóxicos e genotóxicos. A apomorfina foi citotóxica em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* de maneira dose-dependente. Além disto, foi capaz de induzir mutações que alteram o quadro de leitura (mutações frameshift) em leveduras e bactérias *Salmonella typhimurium*. Os efeitos citotóxicos e genotóxicos em leveduras foram dependente de fase de crescimento, evidenciando o envolvimento de defesas antioxidantes nestes processos. Em fibroblastos de Hamster Chinês (células V79), a apomorfina inibiu fortemente a proliferação celular. Neste mesmo sistema, a adição de catalase não protegeu as células dos efeitos deletérios da apomorfina. O conjunto de dados deste trabalho indicam que a toxicidade da apomorfina é devido a produtos de sua oxidação, provavelmente sua forma quinônica.

## 11 - SUMMARY

Apomorphine is a benzilisoquinoline alkaloid obtained from morphine, through acid-catalysis in the presence of chloridric acid. Known since 1869, this alkaloid has been used as emetic agent. Nowadays, this drug has received attention due to similarity to dopamine, being considered an important chemical in the treatment of Parkinson disease. Its pharmacological use is limited, since this drug has high instability in biological fluids. This instability is caused by the oxidation of the catecholic group. As described to other catecholamines, e. g. dopamine, this compound is easily oxidized in the presence of molecular ( $O_2$ ). It is stated that same central nervous degenerative disease are correlated to the catecholamine autoxidation. During this process, oxygen reactive species can be generated, as well as other chemical species equally reactive. The apomorphine toxicity was evaluated in three different biological systems and correlated with this autoxidation. The spectrophotometric studies showed that apomorphine undergoes decomposition in a time-dependent way and this process can be potentialized by the presence of iron. In the absence of metallic ions, the apomorphine autoxidation occurs slowly. Potentiometric studies showed that apomorphine posses reductor power, being able to make bieletronic transference to oxidant agents. It was not clear weather during autoxidation apomorphine bieletronic and/or monoeletronic transference are involved. Independently of the kind of transference, apomorphine showed cytotoxic and genotoxic effects. This alkaloid was cytotoxic in a dose-dependent way to yeast *Saccharomyces cerevisiae* and was able to induce

frameshift mutation in yeast and in bacteria *Salmonella typhimurium*. The cytotoxic and genotoxic effects in yeast were dependent of the growth phases, evidencing the involvement of antioxidant status in this processes. In Chinese Hamster fibroblasts (V79 cells), the apomorphine strongly inhibited the cellular proliferation. In the same system the addition of catalase did not protected the cells from the toxic effects of apomorphine. The results showed in this work indicate that the toxicity of apomorphine is due to its autoxidation products, probably its quinonic form.