

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

**EFEITOS DOS ALCALÓIDES HARMINA, HARMALINA,
HARMOL, HARMALOL, HARMANO SOBRE A
RESPOSTA PROLIFERATIVA *IN VITRO* DE
LINFÓCITOS PERIFÉRICOS HUMANOS ESTIMULADOS
POR FITOEMAGLUTININA**

Alessandra Peres

ORIENTADOR: Prof. Dr. Moacir Wajner

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Nance Nardi

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

PORTO ALEGRE

1999

AGRADECIMENTOS

A minha família.

Ao Moacir pelo estímulo profissional e pessoal, pela orientação e amizade.

A Nance pela orientação, carinho e reconhecimento profissional de todos estes anos.

Ao Henriques pelo estímulo e apoio.

A todos os meus colegas do laboratório de imunogenética

Aos colegas do laboratório de Erros Inatos, em especial a Ana Maria.

As pessoas voluntárias que doaram seu sangue tornando válida esta dissertação.

A Ana e ao Clênio.

Ao Elmo.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

As pessoas que dedicam alguns minutos de sua vida para auxiliar, se preocupar com os problemas de outros, são realmente especiais. Dedico esta tese ao Maurício pelos milhares de minutos gastos comigo e pelo carinho que recebo todos os dias.

ÍNDICE

I. Introdução	1
I.1 Alcalóides	2
I.1.1 Aspectos gerais	2
I.1.2 Beta-carbolinas	3
I.1.2.1 Síntese das beta-carbolinas	9
I.1.2.2 Efeitos principais das beta-carbolinas	11
I.1.2.2.1 Sobre o sistema nervoso central	11
I.1.2.2.2 Sobre o sistema cardiovascular	12
I.1.2.2.3 Sobre o DNA: mutagênese e carcinogênese	12
I.2 Sistema imune	16
I.3 Medida da proliferação linfocitária	22
I.4 Sistema imune e alcalóides	23
II. Objetivos	25
II.1 Objetivo geral	26
II.2 Objetivos específicos	26
III. Material e Métodos	27
III.1 Equipamentos	28
III.2 Material permanente	28
III.3 Material de consumo	29
III.4 Meios e soluções	30
III.5 Métodos	31
III.6 Análise estatística	36
IV. Resultados	37
IV.1 Efeito dos alcalóides beta-carbolinas e da cafeína sobre a proliferação <i>in vitro</i> de linfócitos periféricos humanos estimulados por fitoemaglutinina	38
IV.2 Efeito citotóxico das beta-carbolinas	38

IV.3 Efeito do tempo de adição das beta-carbolinas às culturas sobre a reatividade celular de linfócitos periféricos humanos estimulados por fitoemaglutinina	47
IV.4 Efeito da pré-incubação das beta-carbolinas sobre a resposta celular de linfócitos periféricos humanos estimulados por fitoemaglutinina	54
IV.5 Imunofenotipagem dos tipos celulares presentes nas culturas de linfócitos periféricos.	61
V. Discussão	63
VI. Resumo	69
VII. Referências bibliográficas	72

ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela I.1	8
Tabela IV.1	45
Tabela IV.2	53
Tabela IV.3	60

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura I.1	5
Figura I.2	6
Figura I.3	10
Figura I.4	14
Figura I.5	18
Figura I.6	21
Figura IV.1	39
Figura IV.2	40
Figura IV.3	41
Figura IV.4	42
Figura IV.5	43
Figura IV.6	44
Figura IV.7	46
Figura IV.8	48
Figura IV.9	49
Figura IV.10	50
Figura IV.11	51
Figura IV.12	52
Figura IV.13	55
Figura IV.14	56
Figura IV.15	57
Figura IV.16	58
Figura IV.17	59
Figura IV.18	62

ABSTRACT

The alkaloids beta-carbolines were firstly described by Goebel in 1841 in *Peganum harmala*. These alkaloids present effects on the central nervous system, inhibit the monoamine oxidase enzyme, on the cardiovascular system, causing hypotension and bradycardia and on DNA, forming DNA adducts. In the present study we investigated five alkaloids of the beta-carbolines family (harman, harmine, harmaline, harmol and harmalol) and the alkaloid caffeine on the proliferation of lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin (PHA). A recognized *in vitro* for cellular immune response. Mononuclear cells (lymphocytes) obtained from venous peripheral blood from healthy volunteers were cultivated in RPMI1640 in bottom-flat 96 well microplates at 37° C for 96 h. In the presence of 5% CO₂ in air, 1% PHA, 10% autologous serum and each one of the alkaloids in concentrations ranging from 3 to 100 µg/ml⁻¹. In some experiments on 50 µg/ml⁻¹ in others cultures did not contain alkaloids. The MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) method was used to measure cellular proliferation. All five alkaloids from the beta-carbolines family were able to inhibit lymphocyte proliferation in doses on 50 µg/ml⁻¹ and 100 µg/ml⁻¹ while harmol was also immunosuppressive in doses at 25 µg/ml⁻¹. On the other hand, caffeine did not affect lymphocyte proliferation. When the alkaloids were added at different periods after the beginning of cultures (0, 24, 48 and 72 hours) they showed a variable immunosuppressive activity on PHA-treated lymphocytes. None causes inhibition after 72 hours of culture, indicating an early action on cultures. Harmalol and harmano suppress the proliferation only at time 0. Harmine inhibits until 48 h after the beginning of cultures. Harmol and harmine had an intermediate action, since they cause an inhibition until 24 h of culture. All beta-carbolines were able to suppress lymphocyte proliferation when pre-incubated for 4 hours, reflecting an early action on lymphocyte reactivity. Harmine and harmaline presented the greater inhibition on lymphocyte proliferation when were present during the whole culture (pre-incubation and incubation) when were added after pre-incubation the same occurred for harmol, harmalol and harman. When present during the whole culture. However, these alkaloids had a lesser effect when supplemented only after the pre-incubation. The studies

utilizing the flow cytometry confirmed the inhibition effects of these alkaloids, indicating that their action is directed to lymphocytes (CD3+)

I. INTRODUÇÃO

1.1 ALCALÓIDES

1.1.1 Aspectos gerais

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

A classificação dos alcalóides é feita de acordo com sua via biossintética, estrutura química e atividade biológica. Quanto à estrutura química, os alcalóides podem ser classificados em verdadeiros, proto-alcalóides ou pseudo-alcalóides. Os alcalóides verdadeiros e os proto-alcalóides são derivados de aminoácidos, sendo que os primeiros possuem um anel heterocíclico nitrogenado, diferentemente dos proto-alcalóides. Já os pseudo-alcalóides também possuem um anel heterocíclico nitrogenado porém não são originados de aminoácidos (Trease e Evans, 1978).

Os alcalóides estão presentes em cerca de 20 a 40 % das plantas. São encontrados tanto em dicotiledôneas quanto em monocotiledôneas, bem como em alguns gêneros de fungos e em mamíferos. A maior concentração dos alcalóides é encontrada na parte mais ativa da planta durante seu crescimento, geralmente a raiz (Hashimoto e Yamada, 1994).

Em geral, nos mamíferos os alcalóides têm ações múltiplas sobre vários sistemas. Podem estimular ou inibir o sistema nervoso central, podendo bloquear o efeito da acetilcolina. Possuem a capacidade de produzir alterações visuais, como a falta de reflexo para abrir os olhos ou fotofobia. Também agem em outros sistemas, como o respiratório, onde geralmente atuam conforme a dose ingerida, aumentando ou diminuindo a frequência respiratória, e em certos casos levando a uma parada respiratória, o que pode ocasionar a morte do indivíduo. O sistema cardiovascular pode sofrer a ação dos alcalóides. A atuação ocorre diretamente sobre o coração com a alteração da frequência cardíaca. No sistema digestivo, os alcalóides das solanáceas são muito estudados pela propriedade de anular totalmente a secreção de saliva e reduzir a secreção gástrica (Gallo, 1987).

Vários alcalóides já despertaram interesse nos pesquisadores quanto aos seus efeitos tóxicos ou medicinais. No caso de alcalóides tóxicos, os exemplos são a nicotina (*Nicotiana tabacum*) e as solaninas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) e da batata (*Solanum tuberosus*) (Konno *et alli.*, 1991; Witschi *et alli.*, 1997; Friedman *et alli.*, 1996).

A morfina extraída da papoula (*Papaver somniferum*) é um alcalóide muito estudado devido às suas propriedades analgésicas freqüentemente utilizadas na medicina (Sutton *et alli.*, 1997). Existem ainda os alcalóides com efeitos alucinógenos. O LSD (*Lysergic acid diethylamide*) e a cocaína são os mais estudados devido à dependência que estes alcalóides induzem em seus usuários (Abraham e Manem, 1996; Young e Glennon, 1997).

Vincristina é o alcalóide extraído da *Vinca rosea*. É utilizado no tratamento da leucemia não-Hodgkin e em leucemias agudas (Niitsu e Umeda, 1997). Na leucemia do tipo mielóide crônica, o alcalóide eilatina, extraído de um tunicado (*Eudistoma sp*), vem apresentando ótimos resultados na redução da proliferação de células Philadelphia positivas (Einat *et alli.*, 1995).

Existem várias teorias para explicar a produção e a utilização dos alcalóides pelas plantas. Especula-se que sirvam como defesa contra animais (insetos) que poderiam causar algum dano a planta, como reservatório para síntese de proteínas, ou ainda como reguladores de crescimento e reprodução (Costa, 1993).

1.1.2 BETA-CARBOLINAS

Os alcalóides da família das beta-carbolinas foram primeiramente descritos em 1841 por Goebel (apud Meester, 1995) a partir da planta pertencente à família das zygophyllaceae, conhecida como *Peganum harmala*. Estes alcalóides são conhecidos genericamente como alcalóides da harmala. Os nomes mais utilizados são harmina, harmol, harmalol, harmano, harmalina e noraharmano (Allen e Holmstedt, 1980)

As beta-carbolinas pertencem ao grupo de drogas alucinógenas indolalquilaminas, os quais incluem drogas ilegais como o LSD e o N,N, dimetiltriptamina (DMT) (Glennon, 1996).

Além de possuírem um grupo indólico, as beta-carbolinas apresentam um anel piridínico hidrogenado. Conforme a estrutura do anel piridínico e dos substituintes R₁ e

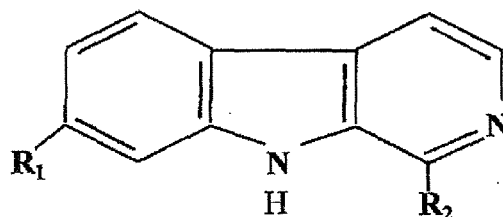
R₂, pode-se observar três grupos. No primeiro grupo o anel é insaturado e tem-se as beta-carbolinas (BCs). Através da variação da estrutura dos substituintes, encontram-se os alcalóides harmano, noraharmano, harmol e harmina. O segundo grupo é formado pelas diidro-beta-carbolinas (DHBC), nas quais o anel piridínico está na forma parcialmente insaturada. Novamente, levando-se em consideração a variação dos substituintes, tem-se diferentes alcalóides como a harmalina e o harmalol. Existe ainda um terceiro grupo, com o anel piridínico totalmente saturado conhecido como tetraidro-beta-carbolinas onde se encontram os alcalóides THBC, 2MT-THBC, 2MeO-THBC e 1 MT-THBC, dependendo da variação da estrutura dos substituintes (Figura I.1) (Allen e Holmstedt, 1980).

A planta mais utilizada comercialmente para a extração dos alcalóides das beta-carbolinas é a *Syrian* ou *African rue* (*Peganum harmala*), conhecida como harmala. É a planta que possui a maior concentração dos alcalóides harmina e harmalina, cerca de 3% do peso seco. A *Peganum harmala* é um pequeno arbusto de clima árido. Cresce até um metro de altura, é suculenta, as folhas são verde brilhantes, as flores são pequenas formadas por cinco pétalas, conspícuas e brancas, e florescem entre junho e agosto. Os frutos são em forma de cápsulas valvuladas, que, quando maduras, se abrem liberando várias sementes (McKenna *et alli.*, 1984) (Figura I.2).

A harmala é originária da Ásia central e Síria, e atualmente cresce na costa mediterrânea da Europa, Ásia e África. É usada como corante na Pérsia e na confecção de tapetes na Turquia. A semente tem sabor amargo e produz efeitos psicoativos, que são utilizados na Ásia com finalidade alucinógena. Acredita-se que a lenda dos tapetes voadores é consequência do efeito alucinógeno destes alcalóides. Na Índia e no nordeste do Tibete os alcalóides são utilizados como medicamento para sífilis, febre, histeria, malária, doença de Parkinson, reumatismo, cólica, asma, e ainda como poção do amor, bem como em cerimônias religiosas (Stafford, 1992).

Outra planta muito conhecida por possuir os alcalóides da harmala é a *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae). Cerca de 0,18% a 1,36% do peso seco da planta contém os alcalóides harmala, harmalina e principalmente a harmina (Airaksinen, 1981).

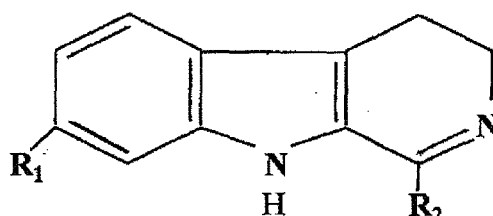
Os egípcios utilizavam a harmala como anti-fúngica e anti-bactericida. Dados

Sistema β -carbolina

norharmano
harmano
harmol
harmina

R_1
H
H
OH
OCH₃

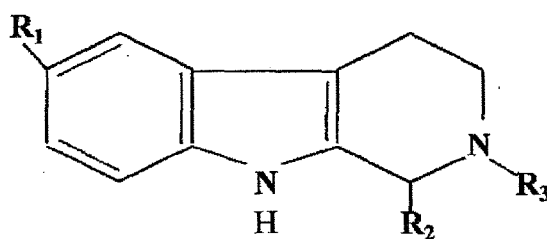
R_2
H
CH₃
CH₃
CH₃

Sistema diidro- β -carbolina

harmalol
harmalina

R_1
OH
OCH₃

R_2
CH₃
CH₃

Sistema tetraidro- β -carbolina

1,2,3,4-tetraidro- β -carbolina (THBC)
2-metil-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolina (2MT-THBC)
6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolina (2MeO-THBC)
1-metil-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolina (1MT-THBC)

R_1	R_2	R_3
H	H	H
H	H	CH ₃
OCH ₃	H	H
H	CH ₃	H

Figura I.1: Estrutura dos alcalóides beta-carbolinas



Figura I.2: *Peganum harmala*

na literatura confirmam a ação anti-bactericida, tanto para bactérias Gram-negativas quanto para Gram-positivas, a ação anti-fúngica e a ação anti-prurido destes alcalóides indólicos (El-Saad e El-Rifaie; 1980; Begum *et alli.*, 1996). Hudson e colaboradores (1986) demonstraram atividade anti-viral da harmina para o citomegalovirus murino. Foi também demonstrado, neste mesmo trabalho, o efeito da harmina no processo de infecção da bactéria *Escherichia coli* B23 pelos bacteriófagos M13 e T4BO. O alcalóide diminui a virulência dos bacteriófagos.

Na América do Sul, a casca e a folha da *Banisteriopsis caapi*, malpighiaceae, que contém beta-carbolinas, principalmente a harmalina, são utilizadas na produção de uma bebida conhecida como yage (Colômbia), ayahuasca (Equador) ou caapi (Brasil). Esta bebida é feita a partir da fervura da planta, resultando em um potente alucinógeno utilizado para diversos fins entre eles em rituais religiosos (Naranjo, 1979; Luna, 1984; Schutles, 1994).

Allen e Holmstedt (1980) e Hashimoto e colaboradores (1988) descreveram várias ações dos alcalóides harmano, harmalol e harmalina, extraídos da *Passiflora incarnata*, pertencentes à família das passifloráceas, vulgarmente conhecida como maracujazeiro. Sua ação sedativa e antiespasmódica é utilizada nas neurastenias, nas neuroses devidas a excesso de trabalho, nas perturbações nervosas da menopausa, nas nevralgias, nas insônias e na histeria.

Os alcalóides das beta-carbolinas são encontrados freqüentemente na nossa dieta. Além de estarem presentes em 23 famílias de angiospermas (Tabela I.1), estudos demonstraram sua ocorrência na folha e fumaça do cigarro (cerca de 100 vezes mais concentrados do que os alcalóides encontrados na folha), em bebidas alcoólicas como o uísque, saquê e vinho e também em alimentos excessivamente cozidos. (Poindexter e Carpenter, 1962, Allen e Holmstedt, 1980; Meester, 1995). Estudos feitos com o alcalóide noraharmano demonstraram valores entre 9,3 - 33,5 ng em amostras de urina coletadas durante 24 horas em indivíduos com dieta normal (Wakabayashi *et alli.*, 1997).

ANGIOSPERMAS

Apocynaceae
Bignoniaceae
Calycanthaceae
Chenopodiaceae
Elaeagnaceae
Gramineae (Poaceae)
Lauraceae
Leguminosae
Loganiaceae
Malpighiaceae
Myristicaceae
Ochnaceae
Palmae (Arecaceae)
Papaveraceae
Passifloraceae
Polygonaceae
Rubiaceae
Rutaceae
Sapotaceae
Simaroubaceae
Solanaceae
Symplocaceae
Tiliaceae
Zygophyllaceae

Tabela I.1: Famílias de angiospermas onde as beta-carbolinas estão presentes
(Adaptado de Allen & Holmstedt, 1980)

Estes alcalóides estão presentes endogenamente em mamíferos, incluindo o homem, localizando-se em diferentes líquidos biológicos e tecidos. A presença das beta-carbolinas já foi descrita no soro, no leite, na urina, no plasma, no cérebro, no cristalino, nas plaquetas e no fígado (Dillon *et alli*, 1976; Bidder *et alli*., 1979; Airaksinen *et alli*., 1981; Iizuka e Yajima, 1993; Meester, 1995).

Acredita-se que estes alcalóides são formados endogenamente, pois a conformação estrutural das beta-carbolinas encontradas no nosso organismo é diferente das beta-carbolinas encontradas na natureza. Enquanto as beta-carbolinas insaturadas e as diidro-beta-carbolinas são freqüentemente encontradas nas plantas possuindo o grupo 1-metila e 7-metoxila ou grupo hidroxila, nos tecidos dos mamíferos encontramos primordialmente as tetraidro-beta-carbolinas com ou sem o grupo metoxila ou hidroxila na posição 6 (Airakinsen e Kari, 1981).

I.1.2.1 Síntese das beta-carbolinas

Na década de 80 foi demonstrado que a formação das beta-carbolinas se dá através da condensação entre uma indolamina (triptamina) e um aldeído (acetaldeído ou formaldeído) (Reação de Pictet-Spengler, Figura I.3). Esta reação ocorre na ausência de enzimas e em pH fisiológico. A partir desta condensação forma-se o 1-metila-1-carbóxi-tetraidro-beta-carbolina que é metabolizado através do anel hidroxilado (na posição 5-, 6- e 7-), descaborxilado, metilado e desidrogenado formando os compostos da família das beta-carbolinas (Gyynther *et alli*., 1986; Beck *et alli*., 1988; Susilo e Rommelspacher, 1988).

Por outro lado, a formação do alcalóide harmano a partir do acetoaldeído foi verificada em ratos por Rommelspacher e colaboradores (1984). Após a ingestão de etanol, houve um aumento na concentração do alcalóide harmano no cérebro e na urina dos ratos.

Outros investigadores detectaram a presença dos alcalóides na fumaça do cigarro e em alimentos excessivamente cozidos, e atribuíram a presença nos últimos à transformação do triptofano, visto que este aminoácido e as beta-carbolinas são estruturalmente similares (Allen e Holmstedt, 1980; Iizuka e Yajima, 1993). Já Tse e colaboradores (1991) observaram propriedades antioxidantes nas beta-carbolinas similares às encontradas no triptofano e nas triptaminas de onde são originadas.

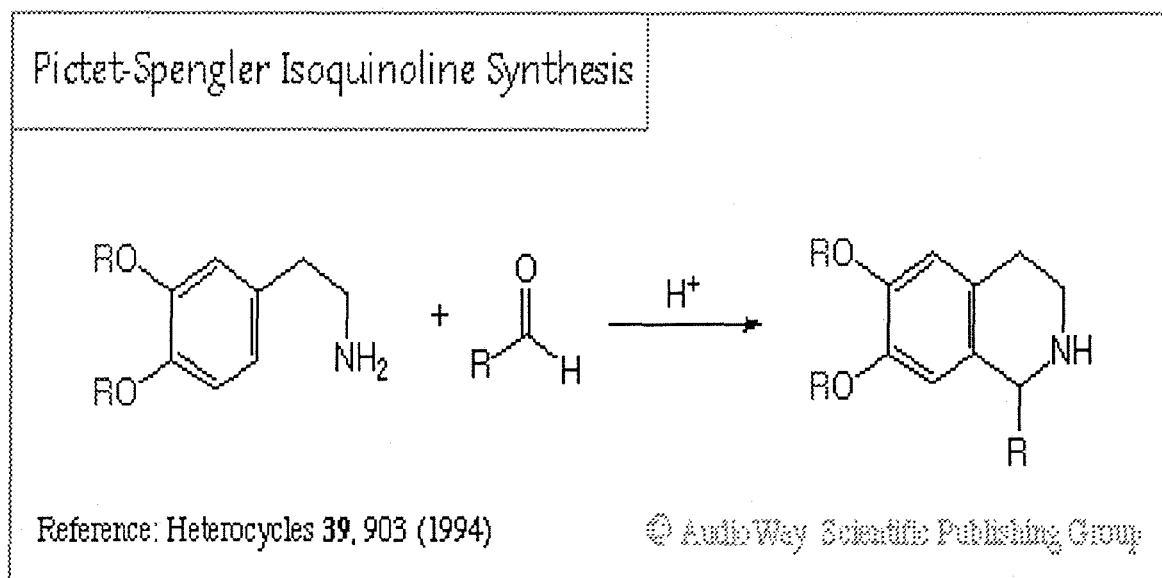


Figura I.3: Reação de Pictet-Spengler

Eles verificaram também que as beta-carbolinas possuem propriedades antioxidantes em vários órgãos de ratos, sendo que o harmalol, pertencente ao grupo das diidro-beta-carbolinas, possui a maior atividade antioxidante, quando comparada com o harmano, harmina e harmol.

I.1.2.2 *Efeitos principais das beta-carbolinas*

I.1.2.2.1 Sobre o Sistema Nervoso Central (SNC)

Vários efeitos sobre o SNC têm sido atribuídas às beta-carbolinas.

A administração dos alcalóides harmalina, harmano, noraharmano e harmina induz tremores em gatos, macacos e camundongos, e tal efeito parece dever-se à ligação a receptores de triptaminas (Lamarre *et alli.*, 1971; Airaksinen *et alli.*, 1987; Kawanishi *et alli.*, 1994). Por outro lado, foi demonstrado que o alcalóide noraharmano possui a capacidade de induzir, em homogeneizados de cérebro, a produção *in vitro* da toxina 2,9-Me₂NH⁺ que parece estar relacionada com a degeneração nigrostriatal, a estrutura cerebral afetada na doença de Parkinson (Matsubara *et alli.*, 1998).

Além disso, vários estudos demonstraram que a harmina, o harmano e a harmalina inibem provavelmente a enzima monoamino oxidase A (MAO A). Estudos feitos em retina bovina também confirmam a inibição da MAO pelo harmano, harmina e harmalina (Most, 1985; Rommelspacher *et alli.*, 1991; Callaway, 1993; Fernandez de Arriba *et alli.*, 1994; May *et alli.*, 1994; Rommelspacher *et alli.*, 1994; Kim *et alli.*, 1997).

Tendo em vista que a MAO é uma das enzimas mais importantes na inativação das aminas epinefrina, norepinefrina, adrenalina, noradrenalina, dopamina e serotonina em metabólitos fisiologicamente inativos no corpo humano, entende-se porque sua inibição provoca acúmulo desses compostos, quando na ingestão de alimentos ricos em aminas tais como queijos velhos, cerveja, vinho, fígado de galinha, grandes quantidades de café, frutas cítricas e chocolate, com repercussões das mais variadas, como por exemplo crises hipertensivas. Por outro lado, o efeito de anfetaminas, sedativos anti-histamínicos, analgésicos potentes e agentes anti-depressivos tornam-se mais prolongados na presença destes alcalóides (Most, 1985).

Foi também observado em um outro trabalho que 300 mg de beta-carbolinas podem provocar alucinações, provavelmente secundárias ao acúmulo das aminas no

sistema nervoso central e ao conseqüente estímulo dos receptores de neurotransmissores (Naranjo, 1967). No entanto, ainda não se sabe se o efeito alucinógeno é devido à inibição da MAO ou à similaridade estrutural das beta-carbolinas com as indolaminas tais como a triptamina e a serotonina. Elas poderiam atuar de forma parecida com o LSD, agindo como agonistas da serotonina ao se ligarem temporariamente aos receptores da serotonina. Neste particular, Glennon (1981) demonstrou que os alcalóides da harmala possuem a capacidade de se ligar a receptores de serotonina (5-HT) de maneira competitiva. O sítio de ligação (sítio amino) do alcalóide com o receptor 5-HT varia de alcalóide para alcalóide, o que explica as diferentes afinidades que cada alcalóide possui.

Grella e colaboradores (1998) verificaram a capacidade da harmina e da harmalina em se ligar a receptores da serotonina 5-Ht₂ (Marek e Aghajanian, 1996).

Quando o harmano é injetado no hipocampo de ratos LAD (*Low Alcohol Drinking*), os animais passam a ter os níveis de serotonina (5-HT) e norepinefrina aumentados, reforçando a ação das beta-carbolinas sobre a concentração destes neurotransmissores. (Adell e Myers 1995).

Os alcalóides da harmala podem ainda afetar o metabolismo e o armazenamento de neurotransmissores aminérgicos de vertebrados e bloquear a atividade de recaptação da N-acetiltransferase (Wright *et alli.*, 1979). Além disso, foi verificado que o alcalóide harmano bloqueia receptores benzodiazepínicos (Rommelspacher *et alli.*, 1980).

I.1.2.2.2 Sobre o Sistema Cardiovascular

A harmina causa bradicardia e hipotensão em gatos, ratos e seres humanos. Em gatos ainda ocorrem apnea e outras arritmias ventriculares. Já em cães, tanto a harmina quanto a harmalina e o harmalol, provocam hipotensão, bradicardia e aumento da força contrátil do miocárdio em graus varáveis provavelmente dependentes da estrutura química dos compostos (Slotkin e Distefano, 1970; Aarons *et alli.*, 1977).

I.1.2.2.3 Sobre o DNA: Mutagênese e Carcinogênese

Tendo em vista que os genes controlam os seres vivos, alterações no genoma de um indivíduo provocadas geralmente por mutações (substituição de bases nitrogenadas) podem afetar drasticamente seu desenvolvimento e sua própria

sobrevivência (Futuyma, 1995). Desta forma, várias mutações podem ser carcinogênicas.

Várias drogas encontradas na natureza inclusive em nossa alimentação são mutagênicas, carcinogênicas e citotóxicas, despertando grande interesse entre os pesquisadores com a finalidade de compreender os seus mecanismos de ação nos organismos vivos.

Muitos destes compostos são formados pelo aquecimento excessivo de alimentos ricos em proteínas, como por exemplo a carne. Estes compostos podem conter aminas heterocíclicas (HCAs) consideradas carcinogênicas e mutagênicas ou então substâncias com capacidade co-mutagênica como os alcalóides da harmala - harmano e noraharmano - que são formados a partir da pirólise do triptofano. Assim, o risco da exposição de seres humanos às aminas heterocíclicas depende do tipo de alimentação, bem como do tempo e temperatura dos alimentos (Felton *et alli.*, 1997). Indivíduos que se alimentam de carnes muito cozidas correm um risco maior de desenvolver câncer de cólon e reto. Sabe-se também que as HCAs não atuam sozinhas no desenvolvimento do câncer, mas provavelmente são o primeiro passo para desencadear este processo (Gerhardsson *et alli.*, 1991; Sugimura *et alli.*, 1994).

As aminas heterocíclicas são capazes de desenvolver adutos em seres humanos (*DNA adducts*) (Figura I.4). Entende-se por adutos a formação de pontes covalentes entre as fitas do DNA. Estima-se que cada indivíduo entre em contato diariamente com cerca de um grama de aminas heterocíclicas provindas de alimentos cozidos (Wakabayashi *et alli.*, 1997).

Além dos agentes mutagênicos, existem agentes conhecidos como co-mutagênicos. Estas substâncias não são mutagênicas por si só, porém, quando combinadas a outras substâncias, tornam-se mutagênicas, podendo ocasionar uma série de danos ao DNA. Um exemplo já estudado é o das beta-carbolinas não mutagênicas que, quando unidas a determinadas aminas aromáticas presentes em vegetais e na fumaça do cigarro (anilina ou toluidina) que também não são mutagênicas e a um potencializador externo, S9 mix, passam a ser mutagênicas (Wakabayashi *et alli.*, 1997).

Alguns dos mecanismos moleculares responsáveis pela propriedade co-mutagênica destes alcalóides devem-se às suas interações com o DNA (Hayashi, *et*

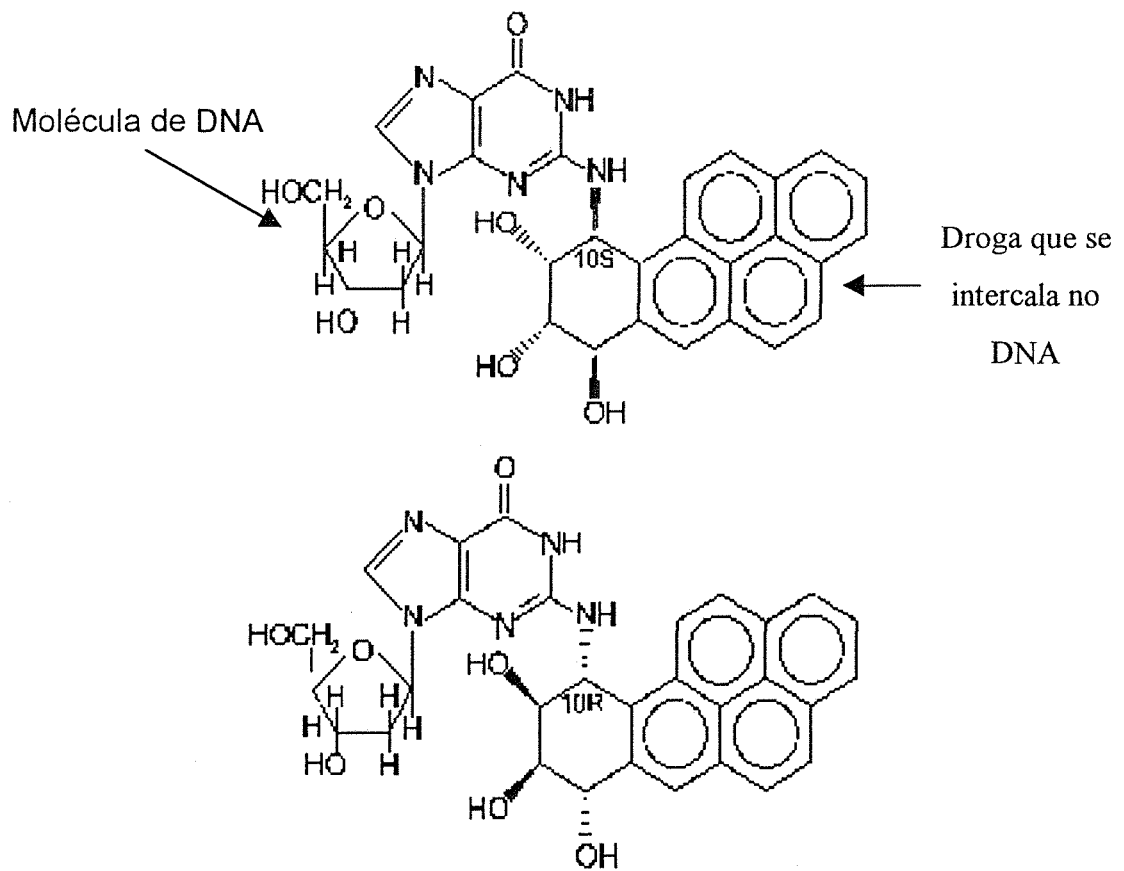


Figura I.4: Exemplo de adutos no DNA

alli., 1977; Duportail e Lami, 1975; Duportail, 1981), semelhantes à interação do brometo de etídio ao DNA. Outro fator seria a capacidade alterar atividades enzimáticas envolvidas no processo de reparo do DNA (Hayashi *et alli.*, 1977; Meester, 1995).

Foi demonstrado que a administração de 0,1% do alcalóide harmano na alimentação diária de camundongos, por quatro semanas, induz adutos no fígado e rins dos animais. Já o alcalóide noraharmano, além de induzir adutos no fígado e nos rins, age da mesma forma sobre o estômago e o intestino grosso (Yamashita *et alli.*, 1988). O noraharmano parece também aumentar a mutagenicidade do benzo[a]pireno, conhecido pelas suas propriedades mutagênicas e carcinogênicas (Levitt *et alli.*, 1977; Fujino *et alli.*, 1978).

Por outro lado, a combinação de derivados de substâncias mutagênicas com o alcalóide harmano, um conhecido agente co-mutagêncio, provavelmente resulta em risco de desenvolvimento de câncer (Boisset *et alli.*, 1994).

Na *Escherichia coli*, danos no DNA ou qualquer interferência em sua replicação por agentes como a radiação ultravioleta ou agentes carcinogênicos levam à indução das funções SOS que correspondem a atividades relacionados com o reparo do DNA. Tendo em vista que o harmano e o noraharmano induzem resposta SOS, é bastante provável a interação dos alcalóides com o DNA (Oda *et alli.*, 1988; Burns e Bottino, 1989; Picada *et alli.*, 1997).

A troca entre cromátides irmãs é um excelente indicador de atividade clastogênica e carcinogênica. Acredita-se que a troca entre cromátides irmãs ocorra durante a formação da forquilha de replicação do DNA na fase S, pois quanto mais perto da finalização do processo de replicação, a incidência de troca entre cromátides irmãs torna-se menos freqüente (Dillehay *et alli.*, 1989). Foi demonstrado que os alcalóides harmano, noraharmano, harmina e harmalina são capazes de inibir a troca entre cromátides irmãs de células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) incubadas com a mitomicina C (droga que provoca a troca entre cromátides irmãs). Provavelmente esta inibição ocorra devido à capacidade destes alcalóides em se intercalar na forquilha de replicação do DNA. Por outro lado, outros investigadores demonstraram que o noraharmano produz um efeito contrário em células CHO, ou seja, o alcalóide induz a troca entre cromátides irmãs (Rutten e Wilmer, 1986). Em linfócitos periféricos

humanos o alcalóide harmano foi capaz de induzir troca entre cromátides irmãs (Abe e Sasaki, 1977; Madle *et alli.*, 1981; Takehisa e Kanaya, 1982; Sasaki e Shirasu, 1993).

As aberrações cromossômicas ocorrem devido a irregularidades na divisão celular ou a acidentes (radiação) que atinja cromossomos interfásicos. Estudos demonstraram que os alcalóides harmano e harmina, após tratamento com luz UV e mitomicina C, juntamente com o metabolizador (S-9) induzem aberrações cromossômicas em células CHO (Burns e Bottino, 1989; Sasaki *et alli.*, 1992).

Além de alterações cromossômicas, os alcalóides da harmala podem induzir mutações por mudança no quadro de leitura (*frameshift mutation*), que se caracteriza pela alteração da seqüência de leitura devido à eliminação de uma ou mais bases. Os alcalóides harmano e noraharmano induzem esta mutação na linhagem *trpE9777* de *Escherichia coli*, enquanto na bactéria *Salmonella typhimurium*, na linhagem TA 1537, o alcalóide harmina após sofrer metabolização produz o mesmo efeito. Já linhagem TA97, juntamente com fração microssomal (S-9) o harmano e o harmol apresentam uma pequena taxa de indução desta mutação (Wehner *et alli.*, 1979; Oda *et alli.*, 1988; Picada *et alli.*, 1997).

1.2 SISTEMA IMUNE

As células formadoras do sistema imune são derivadas de uma célula totipotente conhecida como célula tronco. Para que estas células se desenvolvam e diferenciem, é necessária a ação de vários fatores. Alguns destes fatores já estão bem conhecidos, como é o caso por exemplo dos fatores estimuladores de formação de colônias de macrófagos (M-CSF) e de granulócitos (G-CSF). Outros, como as interleucinas (IL), desempenham funções muito importantes no bom funcionamento do sistema imune. Para exemplificar, a IL-5 pode estimular progenitores hematopoiéticos e o crescimento de eosinófilos ou ainda a IL-2 é capaz de estimular a proliferação de linfócitos (Jones e Millar, 1989; Russel, 1992).

Duas linhagens celulares se diferenciam a partir desta célula tronco: a linhagem mielóide e a linhagem linfóide (Figura I.5).

A linhagem mielóide é formada por células conhecidas como granulócitos, fagócitos mononucleares e megacariócitos, além das hemácias. Os granulócitos têm

função importante na resposta imune inata. Os eosinófilos desempenham atividade importante na eliminação de parasitas e fazem parte da resposta adaptativa. Os neutrófilos apresentam atividade fagocítica. Os mastócitos agem protegendo o indivíduo de diferentes patógenos. São estas células que secretam histaminas, responsáveis pela sensibilidade alérgica. Os basófilos que apresentam função semelhante à dos mastócitos. Os fagócitos mononucleares são compostos pelas células dendríticas, pelos monócitos que circulam continuamente no sangue e pelos macrófagos que são a forma madura dos monócitos. Estes fagócitos, assim como os granulócitos, desempenham papel importante na resposta inata. Existem ainda os megacariócitos que dão origem às plaquetas (Abbas *et alli.*, 1997; Janeway e Travers, 1996).

A linhagem linfóide é formada pelos linfócitos B e T e pelas células NK (*Natural Killer*). Os linfócitos B quando ativados se diferenciam em plasmócitos e secretam anticorpos. Os linfócitos T estão subdivididos em três populações: os linfócitos T auxiliares (CD4+) que ativam outras células como os macrófagos e linfócitos B; os linfócitos T citotóxicos (CD8+) que eliminam as células infectadas com vírus ou bactérias e os linfócitos T supressores que parecem estar relacionados com a regulação dos linfócitos T auxiliares e T citotóxicos. As células NK são importantes na primeira linha de defesa contra agentes infecciosos e células metastáticas.

Os antígenos podem ser transportados para diversos órgãos (linfonodos, baço, amídalas, adenóides, apêndice e intestino) e tecidos (epitélios e mucosas) específicos do sistema imune. Desta forma os linfócitos e fagócitos que estão sempre transitando entre a circulação sanguínea e estes órgãos e tecidos entram em contato mais facilmente com estes antígenos.

Os órgãos linfóides são classificados em centrais ou primários e periféricos ou secundários. Fazem parte dos órgãos linfóides primários a medula óssea e o timo. É na medula óssea que as células B e T são originadas, porém apenas a célula B irá maturar neste órgão. A maturação da célula T irá ocorrer no timo. Os linfócitos migram dos órgãos primários para os órgãos linfóides secundários, entre os quais há os linfonodos

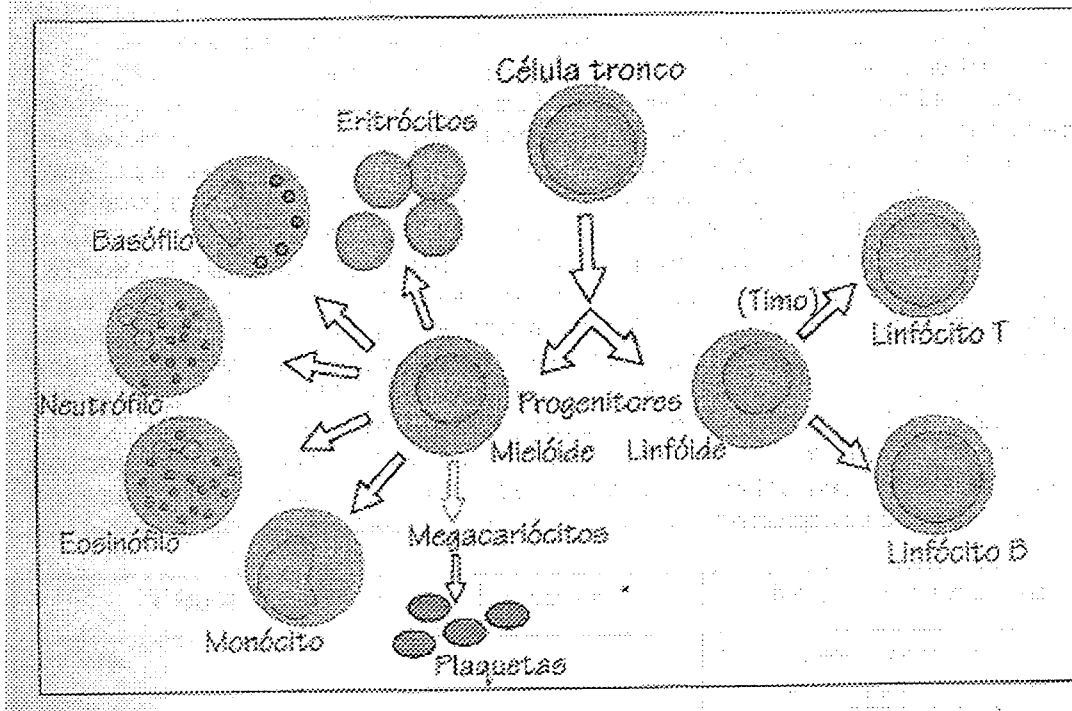


Figura I.5: Células originadas a partir da célula tronco

que são formados por uma rede de veias conhecidas como veias linfáticas e também pela linfa que é o fluido drenado dos tecidos. É através da linfa que os antígenos são capturados. Os linfonodos possuem centros germinativos onde os linfócitos B, após o contato com o antígeno, irão se diferenciar e proliferar. O baço também faz parte dos órgãos secundários e possui a capacidade de capturar antígenos do sangue. As amídalas, adenóides, intestino, apêndice e a estrutura localizada no intestino conhecida como placas de Peyer, também são órgãos linfóides secundários e podem capturar antígenos retirando-os da circulação.

Células apresentadoras de antígeno ou APC (*Antigen Presenting Cells*) são células acessórias do sistema imune e estão localizadas tanto na circulação quanto nos órgãos linfóides, sendo fundamentais na resposta contra patógenos. Várias células fazem parte do grupo: as células dendríticas, os macrófagos, as células B e as células epidérmicas de Langerhans. Todas estas células possuem em comum a capacidade de fagocitar, lisar, processar e apresentar o antígeno no contexto do complexo maior de histocompatibilidade para as células T.

O complexo maior de histocompatibilidade (MHC) são moléculas que apresentam ao sistema imune diferentes peptídeos originadas dos antígenos que foram primeiramente fagocitados, lisados e processados. Existem dois tipos de moléculas do MHC: de classe I e de classe II. As moléculas de classe I estão presentes em todas as células nucleadas do organismo. Já as moléculas de classe II estão presentes somente nas células B, APC e linfócitos T em estágios específicos de ativação.

O organismo possui duas maneiras de responder aos diferentes patógenos: através da resposta inata e da resposta adaptativa.

A resposta imune inata funciona como uma primeira linha de defesa contra patógenos. Fazem parte desta resposta a pele, a gordura, as mucosas, as células fagocíticas e o sistema de complemento. Caso haja insucesso, a resposta imune inata pode dar início e direcionamento à resposta adaptativa.

A resposta adaptativa possui um sistema integrado de defesa onde inúmeras células e moléculas agem de forma cooperativa. Os linfócitos possuem um dos papéis mais importante no desenvolvimento da resposta adaptativa. Tanto as células B quanto as células T possuem receptores em suas superfícies para o reconhecimento de antígenos. Nas células B os receptores são as imunoglobulinas ou Igs e nas células T, os receptores de células T ou TCRs (Figura I.6).

Para que ocorra ativação dos linfócitos T CD4+ são necessários pelo menos dois sinais. Um primeiro sinal é dado pelo reconhecimento do complexo antígeno e MHC II na superfície da célula APC, e os sinais secundários são fornecidos por fatores solúveis como por exemplo a interleucina-1. A formação do complexo antígeno/MHC se faz necessária pois os linfócitos T CD4+ são incapazes de reconhecer o antígeno em seu estado natural. A célula B, no entanto, reconhece o antígeno na sua forma nativa ou solúvel.

O principal sinal de ativação para a proliferação das células T CD4+ é a interleucina-2 (IL-2). Alguns destes linfócitos CD4+ podem se diferenciar em células específicas de memória. Estas células irão formar uma resposta mais específica se entrarem em contato novamente com o antígeno.

Já as células B quando apresentam o antígeno, complexado ao MHC II, para as células CD4+ que reconhecem o antígeno, recebem delas o estímulo para diferenciação e proliferação. As células B diferenciadas são chamadas de plasmócitos e passam a secretar anticorpos.

Os anticorpos são proteínas que reconhecem e neutralizam antígenos solúveis e marcam peptídeos na superfície de patógenos para a destruição destes pelas células fagocíticas ou citotóxicas. Atuam por diferentes mecanismos: I. a resposta do anticorpo para antígenos de superfície ou patógenos invasores pode ser muito forte, e o anticorpo pode ser capaz de reduzir o título de partículas virais significativamente; II. anticorpos podem alterar a integridade estrutural de patógenos invasores através de interações com a superfície do antígeno, podendo então tornar este patógeno não infeccioso. Este tipo de resposta com secreção de anticorpos denomina-se resposta humoral.

Outra classe de células B que pode se formar após o sinal de ativação das células T CD4+ são células que não secretam anticorpos mas permanecem com a imunoglobulina na superfície. As células pertencentes a esta classe são conhecidas como células de memória, e podem sobreviver por semanas ou meses mesmo sem nova estimulação antigênica. Elas permanecem circulando entre o sangue, linfa e órgãos linfáticos. A estimulação desta classe de células leva a uma resposta secundária que será mais rápida e mais específica. O objetivo principal das vacinas é o de induzir memória.

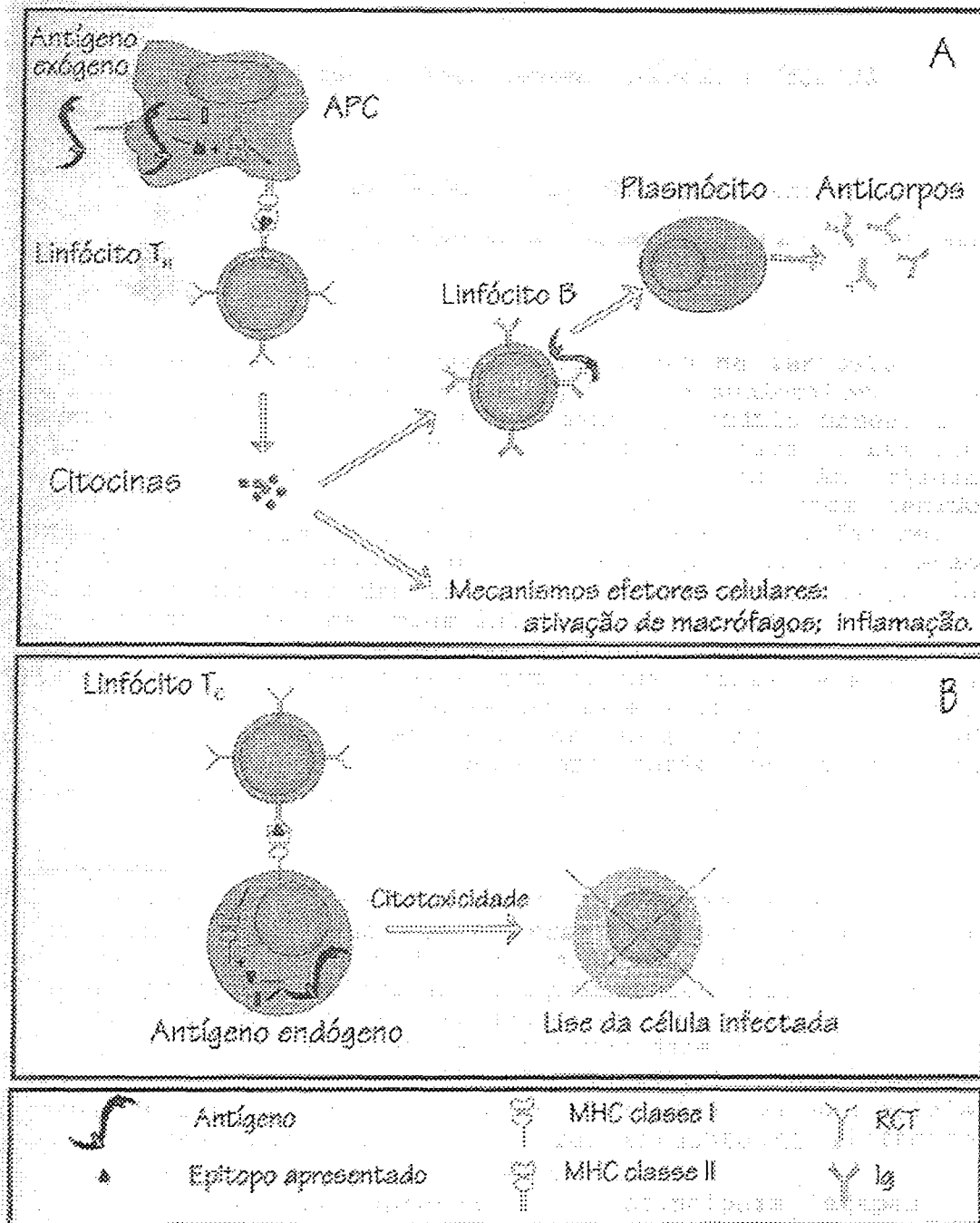


Figura I.6: Resposta imune adaptativa

A resposta celular visa eliminar células tumorais, células infectadas por vírus ou bactérias. Uma outra classe de linfócitos é envolvida: os linfócitos T citotóxicos CD8+ (CTLs) capazes de reconhecer e destruir as células infectadas. Estes linfócitos CD8+ constituem a segunda linha de defesa da resposta adaptativa, uma vez que a resposta humoral gera anticorpos que podem ser capazes de neutralizar vírus e diminuir o número de células infectadas a partir da infecção original.

Várias citocinas atuam no sistema imune e aproximadamente 20 já foram descritas. Por exemplo, a IL-8 é responsável pela atração química de neutrófilos e células T, IL-1 é secretada por monócitos em resposta a endotoxinas bacterianas e a IL-5 é considerada um forte sinal estimulador para a proliferação de eosinófilos e todos os fatores estimuladores de formação de colônias como os G-CSF ou os M-CSF

Apesar da importância fundamental de todas as células do sistema para o desenvolvimento da resposta imune, as células T auxiliares destacam-se como reguladoras de todas as demais. Deste modo, a investigação da competência imunológica de um organismo, ou da influência de diferentes fatores sobre esta competência, concentram-se assim sobre estas células.

1.3 Medida da proliferação linfocitária

Diferentes ensaios medem a competência ou resposta imunológica na proliferação linfocitária. Entre os ensaios *in vitro*, destaca-se o que avalia o grau de proliferação de linfócitos T auxiliares.

Estímulos para a proliferação celular *in vitro* podem ser de origem bacteriana, causados por substâncias químicas ou ainda por lectinas. Simulando muitas das condições encontradas *in vivo*, constituem-se em ótimas ferramentas para se estudar o sistema imune.

A detecção de propriedades imunomodulatórias em compostos químicos também é investigada através da medida da proliferação de linfócitos na presença destes compostos. Um aumento da reatividade linfocitária indica atividade imunoestimuladora, enquanto a diminuição da blastogênese celular reflete uma atividade imunossupressora.

As lectinas são proteínas extraídas principalmente de sementes de plantas e de vários invertebrados e promovem a estimulação mitogênica de linfócitos através da

ligação a um carboidrato localizado na membrana celular dos linfócitos. A interação do mitógeno com o linfócito T altera o ciclo celular, levando a célula do estágio G0 ao estágio G1 e à divisão celular. Como consequência, haverá a formação de múltiplos clones de linfócitos.

Os mitógenos mais utilizados são: a fitoemaglutinina (PHA) e concanavalina A (ConA) que estimulam linfócitos T humanos, o *pokeweed* mitogênio que estimula linfócitos B humanos e o lipopolissacarídeo (LPS) que estimula linfócitos B murinos (Brooks *et alli.*, 1987; Nix *et alli.*, 1990; Sofuni *et alli.*, 1992). Vários métodos podem determinar o grau de proliferação linfocitária, entre eles a incorporação de timidina triciada no DNA celular e o teste de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) que se baseia na atividade das desidrogenases, presentes nas células viáveis.

I.4 Sistema imune e alcalóides

A capacidade de interação entre diversos alcalóides e o sistema imune vem sendo objeto de estudos de muitos pesquisadores. O grande interesse neste tipo de estudo é o de descobrir prováveis drogas que atuem como imunossupressores ou imunostimuladores podendo ser importantes no tratamento de transplantes, enxertos ou estímulo de células com função anticarcinogênica.

Algumas destas drogas estão bem caracterizadas. A morfina (*Papaver somniferum*) possui a capacidade de inibir a ativação transcricional da interleucina-2 em tímócitos de camundongos e é um potente imunossupressor, inibidor de células T e B (Lu *et alli.*, 1996; Roy *et alli.*, 1997; Sacerdote *et alli.*, 1997; Hilburger *et alli.*, 1997). O alcalóide nicotina (*Nicotiana tabacum*) causa inibição da formação de plasmócitos quando ratos ficam expostos por tempo prolongado à fumaça do cigarro e diminui, *in vitro*, o número de células T CD4+ (Geng *et alli.*, 1995; Zhang e Petro, 1996). O alcalóide *deoxynupharidine* (DON), extraído do rizoma *Nuphar pumilum*, foi estudado como inibidor de outros fatores de crescimento entre os quais a IL-1 e o interferon (Zhang *et alli.*, 1995). Um alcalóide muito citado na literatura é o alcalóide *swainsonine* que possui a capacidade de estimular a proliferação de células imunocompetentes, podendo inibir o crescimento de tumores em metástase e tumores sólidos (Olden *et alli.*, 1991; Goss *et alli.*, 1996, 1997; Bowen *et alli.*, 1997). Além disso, a administração de cocaína a camundongos faz com que o número de células T,

B, NK e macrófagos seja reduzida (Xu *et alli.*, 1997). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram a redução da concentração de IL-1 e IL-2 após a adição de cocaína a culturas de células mononucleares retiradas de cordão umbilical (Karlík *et alli.*, 1998).

No presente trabalho foram investigadas atividades imunomodulatórias nos alcalóides da harmala (harmina, harmalina, harmol, harmalol e harmano) e foi utilizado o alcalóide cafeína como controle das culturas.

II. OBJETIVOS

II.1 OBJETIVO GERAL

Detectar atividades imunoregulatórias *in vitro* em alcalóides da família das beta-carbolinas.

II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito dos alcalóides harmina, harmalina, harmol, harmalol, harmano sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos periféricos humanos estimulados por fitoemaglutinina medida pelo teste colorimétrico MTT.
- Determinar a ação dos alcalóides harmina, harmalina, harmol, harmalol e harmano sobre a proliferação de subtipos de linfócitos periféricos humanos através do uso de citometria de fluxo.
- Analisar o efeito citotóxico dos alcalóides harmina, harmalina, harmol, harmalol e harmano sobre linfócitos periféricos humanos.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 EQUIPAMENTOS

Agitador, FANEM Mod. 255-B, São Paulo, SP, Brasil

Agitador magnético, Biomatic Aparelhos Científicos Ltda, Modelo 1001, São Paulo, SP, Brasil

Agitador Vortex, PHOENIX Mod. AT 56, São Paulo, SP, Brasil

Autoclave vertical, Biomatic Aparelhos Científicos Ltda, São Paulo, SP, Brasil

Balança analítica, FICCULAB V-200, São Paulo, SP, Brasil

Bomba de vácuo, Masterflex Cole-Parmer Mod. 7016-52, São Paulo, SP, Brasil

Citômetro de fluxo, Becton/Dickinson, FACSCalibur, São Paulo, SP, Brasil

Centrífuga refrigerada, Sorvall RT 6000B, Wilmington, DE, EUA

Deionizador Permutation – Equipamentos e Produtos Químicos Ltda, São Paulo, SP, Brasil

Destilador Biomatic

Espectrofotometro de microplaca, Titertek multiskan

Esterilizador de ar, Steriler-Yashic. São Paulo, SP, Brasil

Estufa FANEM Ltda, Modelo 002 CB

Estufa CO₂, Forma Scientific, modelo 3337, São Paulo, SP, Brasil

Filtro de esterilização, Millex-Millipore, São Paulo, SP, Brasil

Fluxo laminar, TROX Modelo FLV Série 448, São Paulo, SP, Brasil

Forno de microondas, Panasonic, São Paulo, SP, Brasil

Medidor de pH, Digimed, Modelo DMPH-1, São Paulo, SP, Brasil

Microscópio óptico, CARL ZEISS Standard 004 Br binocular, Alemanha

Microscópio invertido, CARL ZEISS ID03

Purificador de água, Milli-Q Plus Millipore

III.2 MATERIAL PERMANENTE

Pipeta de repetição, Eppendorf, modelo 4780

Pipeta multicanal 250 µl, Gilson

Pipetador automático Pipet-Aid, Drummond Scientifico

Pipetas reguláveis, Gilson Pipetman, modelo P10, P20, P100, P200 e P1000

III.3 MATERIAL DE CONSUMO

III.3.1 *Materiais*

Agulhas 25 x 7, Precisionglide, Becton/Dickinson

Câmara de Neubauer, Herka

Lamínulas, COVER GLASS 22 x 22 mm

Luvas de látex, SAFESKIN

Membrana 0,45 μm e 0,22 μm , Millipore

Pipetas graduadas de vidro, Laborpeq

Placas de cultura 6 poços com fundo plano, Corning

Placas de cultura 96 poços com fundo plano, Corning

Seringas descartáveis 1, 5 10 e 20 ml, Plastipak

Seringas de repetição eppendorf 10, 50 e 100 μl

Ponteiras 0,2 e 1 ml, Costar, modelo 4862

Tubos cônicos 15 e 50 ml, Corning

III.3.2 *Reagentes*

Ácido clorídrico P.A., Merck (Darmstadt, Germany)

Ácido pirúvico, Sigma Chemical Company (Saint Louis, MO, EUA)

Alcalóides: Harmina, Harmano, Harmol, Harmalol, Harmalina e Cafeína, Sigma

Anticorpo anti-CD13 PE, Ambriex (São Paulo, SP, Brasil)

Anticorpo anti-CD19 PE, Ambriex

Anticorpo anti-CD3 PE, Ambriex

Azul Tripán, Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)

Bicarbonato de sódio, Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)

DMSO – Dimethyl Sulphoxide, Sigma

Fitoemaglutinina, Gibco (Grand Island, NY, U.S.A)

Garamicina 60 mg, Schering-Plough (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)

Glicose, Sigma

Solução Hank's, Sigma

Hepes, Gibco BRL

Histopaque 1077, Sigma

Liquemine, Roche (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)

Meio RPMI 1640, Sigma

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide), Sigma

III.4 MEIOS E SOLUÇÕES

III.4.1 *Corante para as células*

Foi utilizado uma solução de azul tripan a 0,2 % (p/v) em água destilada deionizada. No momento do uso, esta solução foi diluída 1:1 em meio RPMI 1640.

III.4.2 *Meio de cultura*

Em 900 ml de água proveniente do Milli-Q foi adicionado um frasco de meio de cultura RPMI 1640, 2 g de bicarbonato de sódio, 60 mg de garamicina, 4,76 g de HEPES e 0,11 g de piruvato de sódio. O pH foi ajustado para 7,15, com ácido clorídrico 12 N. O volume foi completado até 1000 ml e os meios esterilizados por ultrafiltração em Millipore (0,22 μm). O meio foi estocado a 4° C por no máximo 30 dias.

III.4.3 *Solução de lavagem*

Em 900 ml de água proveniente do Milli-Q foi adicionado solução Hank's e 2 g de bicarbonato. O pH foi ajustado para 7,15, com ácido clorídrico 12 N. O volume foi completado para 1000 ml e esterilizado por ultrafiltração em Millipore (0,22 μm). O meio foi estocado a 4° C por no máximo 30 dias.

III.4.4 *Soluções dos alcalóides*

As soluções dos alcalóides harmalina, harmina, harmalol, harmol e harmano foram preparadas no dia do experimento com a solução mãe na concentração de 2 mg/ml⁻¹ em meio RPMI 1640. A partir desta solução, a concentração desejada, para cada experimento, foi obtida por diluição em meio RPMI 1640.

Todos as soluções dos alcalóides foram preparados no escuro.

III.4.5 Solução de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

Foram dissolvidos 5 mg de MTT por ml de meio RPMI 1640. Esta solução foi protegida da luz e mantida por 5 minutos sob agitação lenta seguida de filtração (filtro 0,22 μm).

III.4.6 Solução de fitoemaglutinina

Estudos anteriores de nosso grupo (Schottfeldt *et alli*, 1995) mostraram que a concentração ideal para a indução de proliferação linfocitária com o mitógeno fitoemaglutinina (PHA), extraída da planta *Phaseolus vulgaris*, é de 1% em culturas de 96 horas de duração. Foi então preparada uma solução de PHA 4% de modo que a concentração final em cultura ficasse em 1%.

III.5 MÉTODOS

III.5.1 Amostras de sangue e separação das células mononucleares

Amostras de sangue venoso periférico (20 ml) oriundas de indivíduos saudáveis, com idade entre 18 e 55 anos, foram coletadas em seringas heparinizadas.

O sangue foi centrifugado a 400 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Após esta centrifugação, 5 ml do plasma foram removidos para posterior utilização. O plasma foi centrifugado a 800 g por 5 minutos e as hemácias e restos celulares descartados.

Após a retirada do plasma, foi adicionado um volume de 3 ml de solução Hank's de modo a diluir o sangue 1:2. Sete mililitros do sangue diluído foram adicionados lentamente a 3 ml de Histopaque 1077 previamente colocados em tubos cônicos de 15 ml de capacidade. Os tubos foram centrifugados a 400 g por 30 minutos a temperatura ambiente. A fase contendo a camada de células mononucleares foi coletada com pipeta Pasteur e as células foram lavadas 2 vezes a 400 g por 7 minutos em solução Hank's a temperatura ambiente. Foram adicionados 5 ml de meio RPMI 1640 nos tubos contendo as células e uma alíquota de 100 μl foi retirada de cada tubo

para contagem (adaptado de Boyum, 1968). A suspensão de células foi feita em meio RPMI 1640 em uma concentração de plasma autólogo de 20%.

III.5.2 *Contagem das células*

Foi adicionado 50 µl de azul de tripan 0,2% (p/v) a uma alíquota de 50 µl da suspensão de linfócitos. Os linfócitos foram contados em câmara de Neubauer com aumento de 40 X. Na última etapa, o volume das células foi ajustado com meio RPMI 1640 para que a concentração ficasse em 16×10^5 células.ml⁻¹.

III.5.3 *Cultivo celular*

As culturas foram preparadas em microplacas de fundo plano com 96 poços em ambiente estéril no fluxo laminar. Os alcalóides foram adicionados inicialmente às placas nas doses desejadas em um volume final 50 µl, sempre protegidos da luz. Em seguida, o mitógeno fitoemaglutinina foi adicionado também em volume de 50 µl. Por último, 100 µl da suspensão contendo as células e plasma autólogo foram adicionados à cultura. O volume final de cada poço na cultura foi de 200 µl.

Todas as culturas foram feitas em triplicata e a média das triplicatas escolhidas para os cálculos.

Culturas teste

100 µl de suspensão celular (16×10^4 células)

50 µl do mitógeno fitoemaglutinina

50 µl do alcalóide

Culturas controle

100 µl de suspensão celular (16×10^4 células)

50 µl do mitógeno fitoemaglutinina

50 µl de meio de cultura

As placas foram cobertas com tampa plástica, envolvidas em papel alumínio. Este procedimento permite a troca de gases, mas não a saída de água e tampouco a

ação da luz sobre os alcalóides. As placas foram incubadas a 37°C em uma atmosfera úmida com 5 % de CO₂ em ar por um período de 96 horas.

Após o término da incubação, as placas foram centrifugadas a 400 g por 10 minutos a temperatura ambiente.

Três diferentes conjuntos de experimentos de cultivo celular foram realizados:

I. As células foram incubadas desde o início das culturas com várias concentrações (100, 50, 25, 12, 6 ou 3 µg.ml⁻¹) dos alcalóides.

II. Em algumas culturas, as células foram inicialmente pré-incubadas por 4 horas com os alcalóides (50 µg.ml⁻¹) e após lavadas por 2 vezes com solução Hank's a 400 g por 5 minutos. No grupo controle, as células foram incubadas por 4 horas com meio RPMI. As células foram então incubadas por 96 horas em uma das condições abaixo:

Grupo 1: células pré-incubadas com o alcalóide, após, incubadas com o mitógeno e o alcalóide

Grupo 2: células pré-incubadas com o alcalóide, após, incubada com o mitógeno

Grupo 3: células pré-incubadas com o meio, após, incubada com o mitógeno e o alcalóide

Grupo 4: células pré-incubadas com o meio, após, incubada com o mitógeno

Grupo 5: células pré-incubadas com o meio, após, incubada apenas com o meio

III. Os alcalóides (50 µg.ml⁻¹) foram adicionados em diferentes tempos (0, 24, 48 ou 72 horas) após o início das culturas. As culturas continham além das células e do mitógeno, um dos alcalóides.

III.5.4 Medida da proliferação linfocitária

Com o objetivo de verificar o efeito dos alcalóides sobre a proliferação linfocitária estimulada pelo mitógeno PHA, utilizou-se o ensaio do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), descrito por Mossman e Fong (1983). Este ensaio substitui o teste com a utilização da [³H]timidina radioativa. O

teste do MTT indica o número de células viáveis a partir da clivagem do sal tetrazolium em um cristal denominado formazan, através da enzima succinato tetrazolium redutase que pertence à cadeia respiratória da mitocôndria. Esta enzima só está ativa em células viáveis. Este cristal formado é dissolvido em DMSO, resultando em uma solução colorida que pode ser medida por absorvância. O valor obtido pela absorvância é diretamente proporcional ao número de células viáveis na cultura.

Após a remoção do sobrenadante, conforme descrito acima, 120 µl de meio RPMI 1640 foram adicionados a cada poço seguidos de 30 µl da solução de MTT. A placa foi incubada por mais 4 horas nas mesmas condições da cultura. Após esta incubação, a placa foi centrifugada a 800 g por 7 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado por aspiração e a dissolução dos cristais feita pela adição de 120 µl de DMSO. A placa foi agitada lentamente durante 30 minutos. A leitura foi feita a 495 nm em espectrofotômetro.

III.5.5 *Teste de citotoxicidade*

As culturas foram preparadas utilizando-se as mesmas concentrações celulares em placas de fundo plano com 6 poços, em ambiente estéril na capela de fluxo laminar. Os alcalóides foram primeiramente acrescentados na cultura nas doses desejadas em um volume final de 250 µl, sempre protegidos da luz. Em seguida, foram colocados 250 µl da suspensão contendo as células na cultura. O volume final de cada poço na cultura foi de 500 µl.

Cultura teste

250 µl de suspensão celular

250 µl do alcalóide em uma de duas concentrações: 100 µg.ml⁻¹ ou 50 µg.ml⁻¹

As culturas foram incubadas por um período de 24 horas e depois transferidas para tubos de 1,5 ml. As células foram centrifugadas a 800 g durante 5 minutos e ressuspendidas em 200 µl de meio RPMI 1640. A viabilidade das células foi determinada utilizando alíquotas de 50 µl com adição de igual volume de azul tripan 0,2% (p/v). A contagem das células foi feita em câmara de Neubauer.

III.5.6 *Citometria de fluxo*

Com a finalidade de verificar qual ou quais os tipos celulares presentes na cultura, foi realizado o teste de tipagem celular por citometria de fluxo. Neste teste, são simultaneamente avaliados alguns parâmetros celulares que incluem: o diâmetro, a quantidade das estruturas granulares e a marcação com anticorpos conjugados a substâncias fluorescentes.

Anticorpos marcados com fluorescência são freqüentemente utilizados para a identificação de receptores de superfície e na diferenciação de subpopulações celulares. Se as células apresentam o marcador de diferenciação (CD) no qual o anti-marcador (anti-CD) foi adicionado, ocorre a ligação do anticorpo na superfície da célula. Como resultado, a célula fica marcada com fluorescência. A estratégia consiste em submeter as células a um feixe de raio laser. No momento que as células marcadas passam pelo feixe de raio laser, ocorre a excitação e a emissão da fluorescência que são captadas e analisadas pelo citômetro.

Neste ensaio, as células, o mitógeno e os diferentes alcalóides foram incubados em placas de fundo plano com 6 poços a 37° C em estufa úmida (5% de CO₂) durante 96 horas conforme abaixo. Após este período, as culturas foram transferidas para tubos de 1,5 ml, centrifugadas a 800 g por 5 minutos a temperatura ambiente e contadas em câmara de Neubauer. As células incubadas com cada um dos diferentes alcalóides foram separadas em 3 tubos (10⁵ células / por tubo). Cada um dos tubos 100 continha 100 µl de tampão fosfato salina com azida 1% e 20 µl de um dos anticorpos: anti-CD3, anti-CD13 ou anti-CD19. Após um período de incubação de 30 minutos a temperatura de 4° C, as células foram lavadas duas vezes por centrifugação a 400 g por 5 minutos com tampão fosfato salina contendo 1 % de azida. Foi então colocado 1 ml de tampão fosfato salina contendo 1% de azida. As células finalmente foram analisadas no citômetro de fluxo. Enfatiza-se que os anticorpos anti-CD3, anti-CD13 e anti-CD19 identificam marcadores de superfície de linfócitos T, monócitos e linfócitos B, respectivamente.

Culturas teste

250 µl de suspensão celular em meio de cultura com 20% de plasma autólogo

125 µl do mitógeno

125 µl do alcalóide (50 µg.ml⁻¹)

Culturas controle

250 µl de suspensão celular em meio de cultura com 20% de plasma autólogo

125 µl do mitógeno

125 µl do meio

II.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos resultados da proliferação celular foi utilizado o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Nie *et alli*, 1975). A média das triplicatas foi usada para os cálculos estatísticos. As médias foram comparadas por análise de variância (ANOVA), seguida do teste de raios múltiplos de DUNCAN, quando o F foi significativo. A análise foi considerada significativa quando $p < 0,05$ (*).

IV. RESULTADOS

IV.1 Efeito dos alcalóides beta-carbolinas e da cafeína sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos periféricos humanos estimulados por fitoemaglutinina

Foram estudados os efeitos de cinco alcalóides provenientes da família das beta-carbolinas (harmano, harmina, harmalina, harmol e harmalol) e do alcalóide cafeína sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos periféricos humanos estimulados pelo mitógeno fitoemaglutinina.

As Figuras IV.1 a IV.6 apresentam, respectivamente, o efeito dos alcalóides harmina, harmalina, harmol, harmalol, harmano e cafeína, em diferentes concentrações, sobre a proliferação linfocitária *in vitro*, expressa por absorbância determinada pelo teste colorimétrico de MTT.

Todas as cinco beta-carbolinas: harmano [F(6, 41)= 11,5290; p<0,01]; harmina [F(6, 41)= 5,7659; p<0,01]; harmalina [F(6, 42)= 8,0478; p<0,01]; harmol [F(6, 41)= 14,7934; p<0,01] e harmalol [F(6, 41)= 10,8163; p<0,01] inibiram a proliferação linfocitária nas doses de 50 e 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, enquanto nas concentrações mais baixas (3 e 6 e 12 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) não houve qualquer tipo de alteração da proliferação linfocitária. O alcalóide harmol foi o único a inibir a resposta linfocitária *in vitro* na concentração de 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (Figura IV.3). Pode-se observar para estas beta-carbolinas um efeito dose-resposta, melhor caracterizado a partir da concentração de 12 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Já a cafeína [F(6, 27)= 0,7027] não causou qualquer alteração na proliferação linfocitária nas doses testadas (Figura IV.6).

A tabela IV.1 sumariza o grau de inibição da proliferação celular provocada pelas beta-carbolinas.

IV.2 Efeito citotóxico das beta-carbolinas

A Figura IV.7 mostra os resultados do teste de citotoxicidade realizado com os alcalóides harmina, harmalina, harmol, harmalol e harmano que foram incubados nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ com as células mononucleares por 24 horas. Após, foi contada a viabilidade celular com o teste do Azul de Tripan. A harmalina, o harmano, o harmol e harmina apresentam citotoxicidade na dose de 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Na dose de 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, apenas a harmalina foi citotóxica.

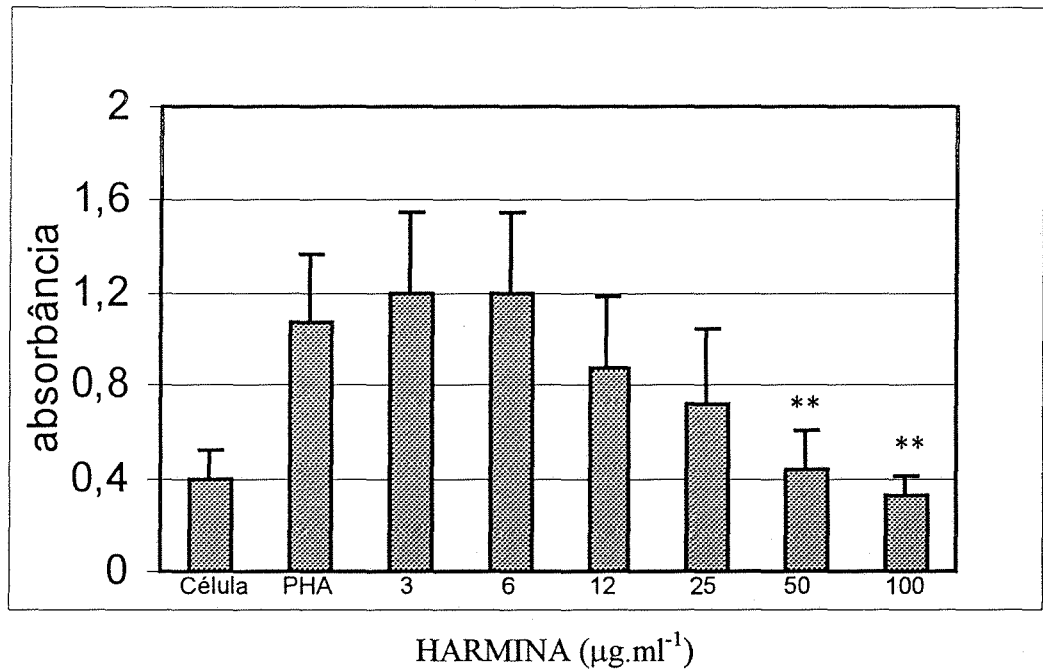


FIGURA IV.1 – Efeito do alcalóide harmina sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos periféricos humanos estimulados pelo mitógeno fitoemaglutinina. Linfócitos periféricos de 6 doadores foram cultivados durante 96 horas na presença de fitoemaglutinina (1% v/v) e do alcalóide em diferentes concentrações (3, 6, 12, 25, 50 ou 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$). Os resultados (média \pm DP) foram expressos em absorbância, determinada pelo método colorimétrico do MTT. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram calculadas por análise de variância, seguida pelo teste de raios múltiplos de Duncan, quando o F foi significativo ** $p < 0,01$, comparado ao grupo controle (PHA), na ausência do alcalóide; Célula = culturas idênticas na ausência de estímulo mitogênico e alcalóide.

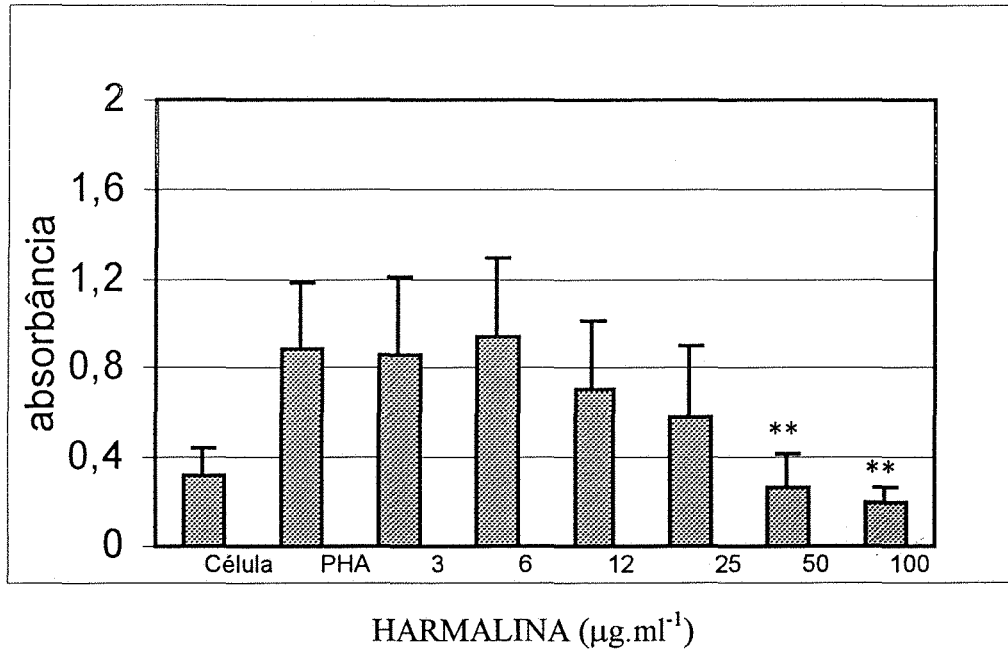


FIGURA IV.2 – Efeito do alcalóide harmalina sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos periféricos humanos estimulados pelo mitógeno fitoemaglutinina. Linfócitos periféricos de 6 doadores foram cultivados durante 96 horas na presença de fitoemaglutinina (1% v/v) e do alcalóide em diferentes concentrações (3, 6, 12, 25, 50 ou 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$). Os resultados (média \pm DP) foram expressos em absorbância, determinada pelo método colorimétrico do MTT. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram calculadas por análise de variância, seguida pelo teste de raios múltiplos de Duncan, quando o F foi significativo ** $p < 0,01$, comparado ao grupo controle (PHA), na ausência do alcalóide; Célula = culturas idênticas na ausência de estímulo mitogênico e alcalóide.

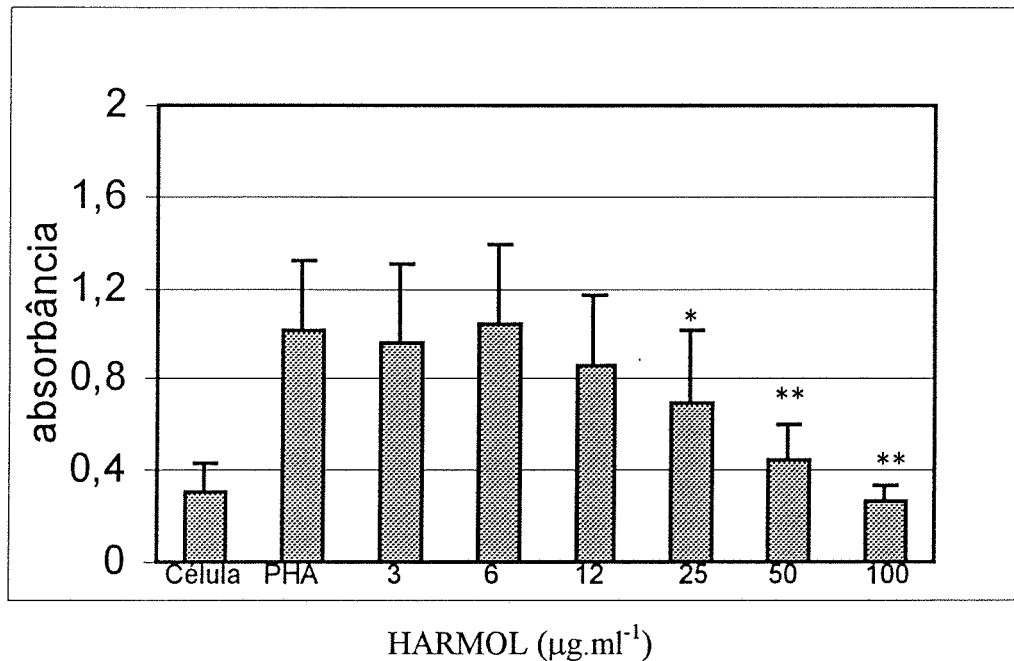


FIGURA IV.3 – Efeito do alcalóide harmol sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos periféricos humanos estimulados pelo mitógeno fitoemaglutinina. Linfócitos periféricos de 6 doadores foram cultivados durante 96 horas na presença de fitoemaglutinina (1% v/v) e do alcalóide em diferentes concentrações (3, 6, 12, 25, 50 ou 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$). Os resultados (média \pm DP) foram expressos em absorbância, determinada pelo método colorimétrico do MTT. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram calculadas por análise de variância, seguida pelo teste de raios múltiplos de Duncan, quando o F foi significativo * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, comparado ao grupo controle (PHA), na ausência do alcalóide; Célula = culturas idênticas na ausência de estímulo mitogênico e alcalóide.

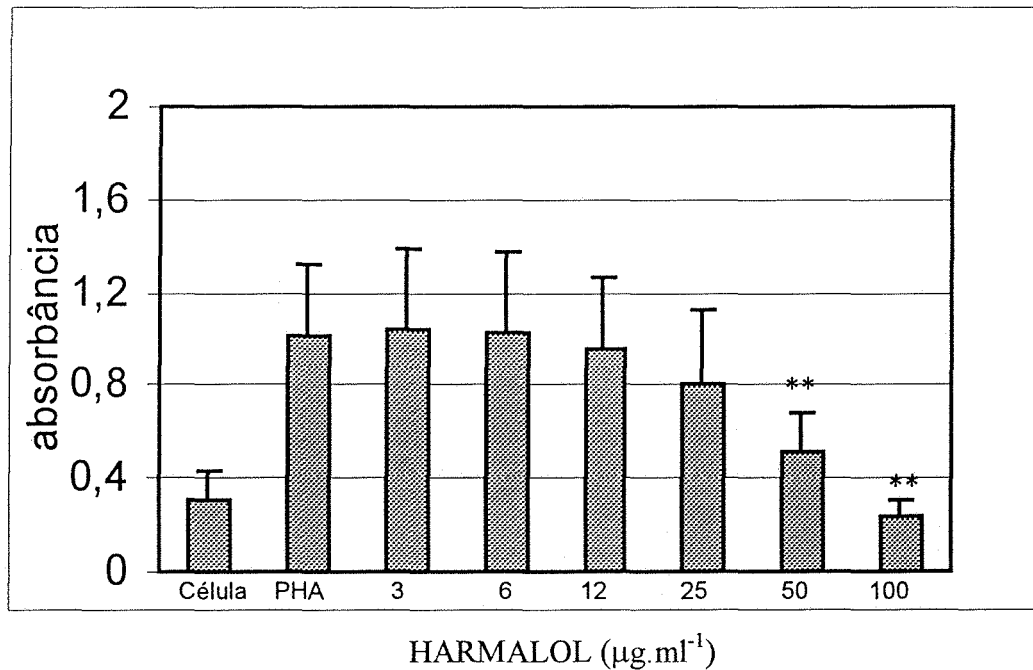


FIGURA IV.4 – Efeito do alcalóide harmalol sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos periféricos humanos estimulados pelo mitógeno fitoemaglutinina. Linfócitos periféricos de 6 doadores foram cultivados durante 96 horas na presença de fitoemaglutinina (1% v/v) e do alcalóide em diferentes concentrações (3, 6, 12, 25, 50 ou 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$). Os resultados (média \pm DP) foram expressos em absorbância, determinada pelo método colorimétrico do MTT. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram calculadas por análise de variância, seguida pelo teste de raios múltiplos de Duncan, quando o F foi significativo ** $p < 0,01$, comparado ao grupo controle (PHA), na ausência do alcalóide; Célula = culturas idênticas na ausência de estímulo mitogênico e alcalóide.

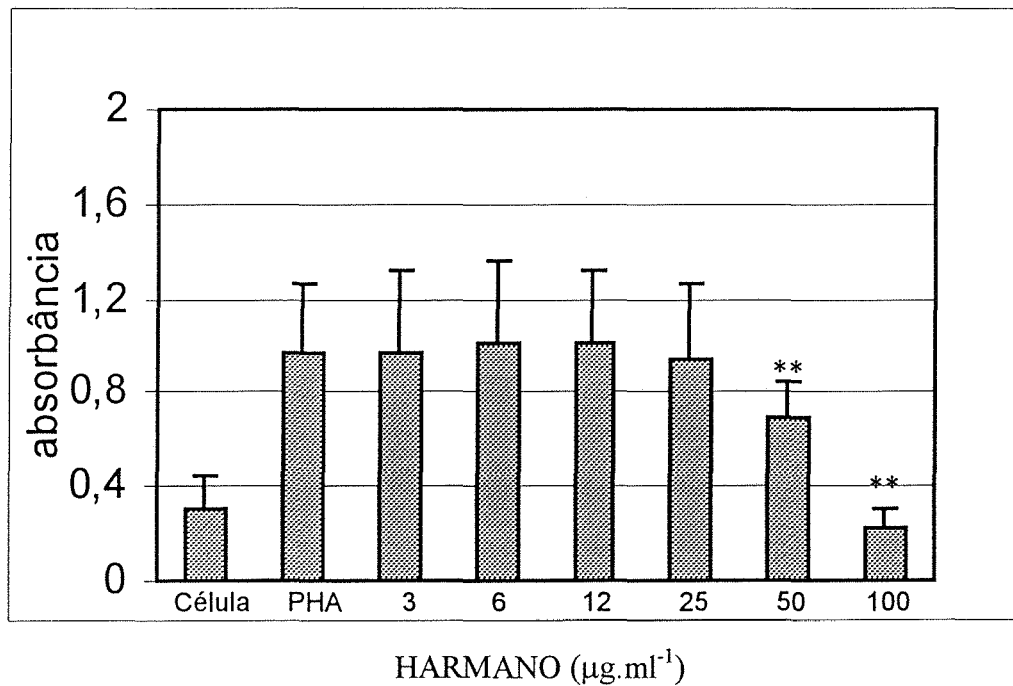


FIGURA IV.5 – Efeito do alcalóide harmano sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos periféricos humanos estimulados pelo mitógeno fitoemaglutinina. Linfócitos periféricos de 6 doadores foram cultivados durante 96 horas na presença de fitoemaglutinina (1% v/v) e do alcalóide em diferentes concentrações (3, 6, 12, 25, 50 ou 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$). Os resultados (média \pm DP) foram expressos em absorbância, determinada pelo método colorimétrico do MTT. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram calculadas por análise de variância, seguida pelo teste de raios múltiplos de Duncan, quando o F foi significativo ** $p < 0,01$, comparado ao grupo controle (PHA), na ausência do alcalóide; Célula = culturas idênticas na ausência de estímulo mitogênico e alcalóide.

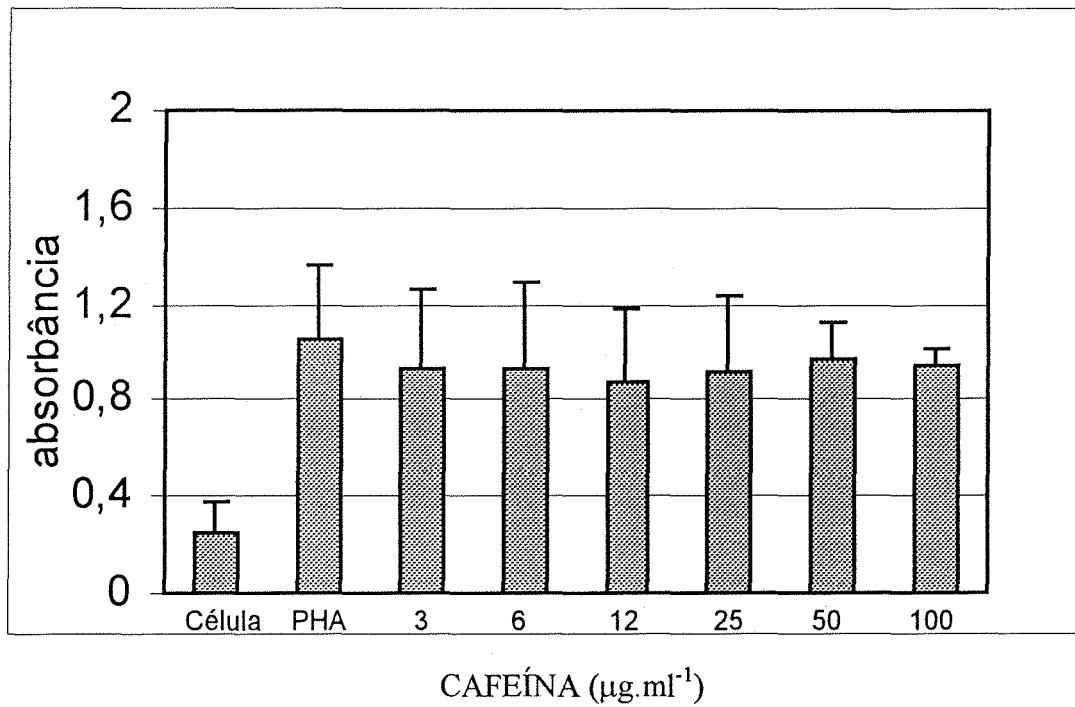


FIGURA IV.6 – Efeito do alcalóide cafeína sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos periféricos humanos estimulados pelo mitógeno fitoemaglutinina. Linfócitos periféricos de 4 doadores foram cultivados durante 96 horas na presença de fitoemaglutinina (1% v/v) e do alcalóide em diferentes concentrações (3, 6, 12, 25, 50 ou 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). Os resultados (média \pm DP) foram expressos em absorbância, determinada pelo método colorimétrico do MTT. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram calculadas por análise de variância. Não houve diferença significativa. PHA = grupo controle na ausência do alcalóide, Célula = culturas idênticas na ausência de estímulo mitogênico e alcalóide.

TABELA IV.1 Inibição da blastogênese linfocitária provocada pelas beta-carbolinas.

Dose ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Inibição da blastogênese (%)				
	Harmina	Harmalina	Harmol	Harmalol	Harmano
3	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
12	18,76 \pm 0,572	21,03 \pm 0,307	15,92 \pm 0,247	5,56 \pm 0,237	-
25	32,48 \pm 0,574	34,04 \pm 0,318	32,26* \pm 0,208	21,28 \pm 0,26	1,87 \pm 0,296
50	58,08** \pm 0,303	70,21** \pm 0,157	69,80** \pm 0,325	49,37** \pm 0,300-	28,03** \pm 0,246
100	68,45** \pm 0,159	78,11** \pm 0,072	85,15** \pm 0,147	76,90** \pm 0,075	76,43** \pm 0,075

Os valores correspondem às médias \pm DP das percentagens de inibição * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, comparado com as culturas controles (0% de inibição) sem a presença dos alcalóides. – Não houve inibição.

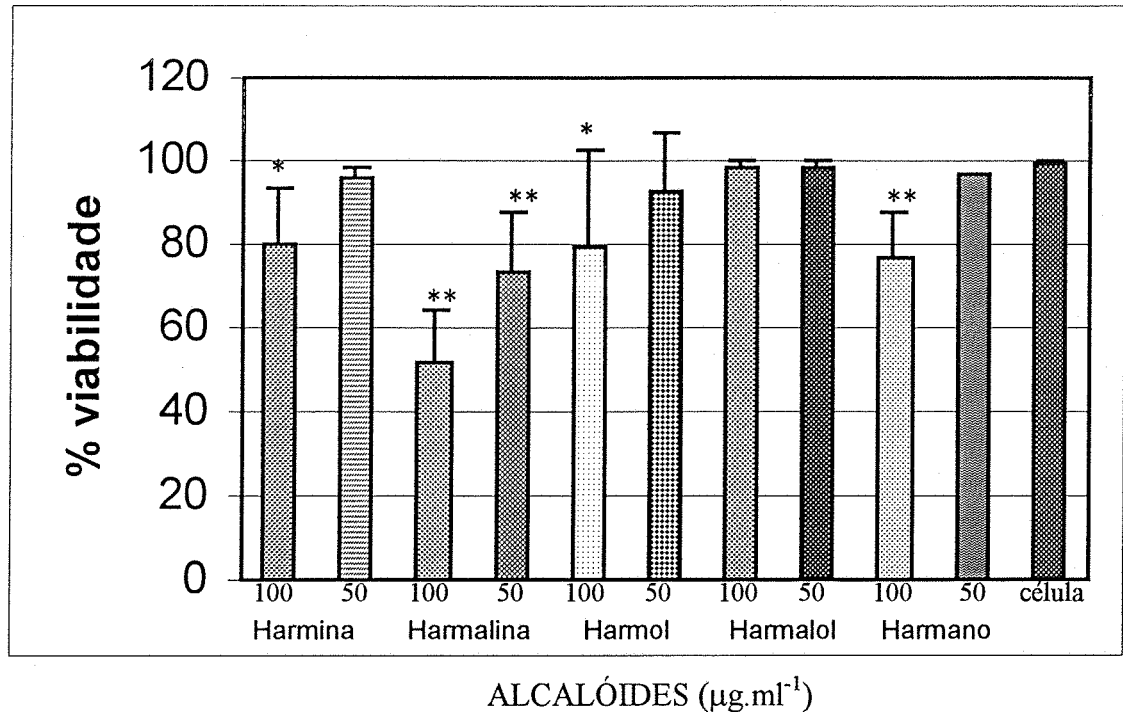


FIGURA IV.7 – Efeito citotóxico dos alcalóides harmina, harmalina, harmol, harmalol e harmano sobre as células mononucleares humanas incubadas por 24 horas. As culturas controle (célula), em que não se adiciona qualquer alcalóide, apresentam 100% de viabilidade. Os valores representam a média \pm DP das percentagens de viabilidade relativamente ao grupo controle (100%). As diferenças entre as médias dos vários grupos foram calculadas por análise de variância, seguida pelo teste de raios múltiplos de Duncan, quando o F foi significativo * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

IV.3 Efeito do tempo de adição das beta-carbolinas às culturas sobre a reatividade celular de linfócitos periféricos humanos estimulados por fitoemaglutinina

Para avaliar a influência do tempo de adição das drogas sobre a reatividade linfocitária, as beta-carbolinas foram colocadas em tempos distintos após o início da cultura. As figuras IV.8 a IV.12 apresentam os resultados destes experimentos quando os alcalóides foram adicionados na concentração de $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ em diversos períodos (0, 24, 48 e 72 horas) do início da cultura. A proliferação linfocitária *in vitro*, expressa pela absorbância, foi determinada pelo teste colorimétrico de MTT.

Quando os alcalóides foram adicionados 72 horas após o início das culturas, não causaram qualquer inibição na reatividade linfocitária. Além disso, apenas a harmina [$F(4, 24) = 10,8938$; $p < 0,01$] foi capaz de inibir a proliferação até 48 horas após o início das culturas. Por outro lado, todos (harmina, harmalina, harmol, harmalol e harmano) inibiram a proliferação linfocitária no tempo 0 hora da cultura, como já havia sido verificado nos experimentos iniciais (Tabela IV.1). Finalmente, com exceção do harmalol [$F(4, 29) = 4,4264$ $p < 0,01$], todos os outros alcalóides das beta-carbolinas (harmina [$F(4, 24) = 10,8938$; $p < 0,01$]; harmalina [$F(4, 29) = 13,3245$; $p < 0,01$]; harmol [$F(4, 19) = 10,5934$; $p < 0,01$] e; harmano [$F(4, 19) = 1,6637$; $p < 0,05$], inibiram a proliferação no tempo de 24 horas.

A tabela IV.2 sumariza estes resultados.

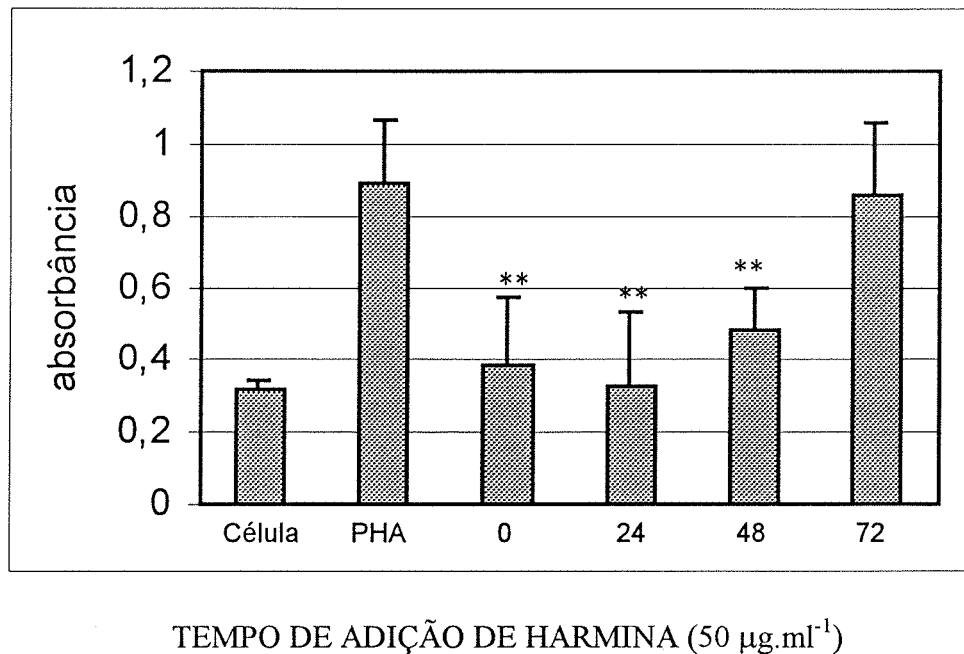


FIGURA IV.8 – Efeito do alcalóide harmina, adicionado em diferentes tempos de adição das culturas, sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos periféricos humanos estimulados pelo mitógeno fitoemaglutinina. Linfócitos periféricos de 5 doadores foram cultivados durante 96 horas na presença de fitoemaglutinina (1% v/v) com adição do alcalóide ($50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) em diferentes tempos após o início da cultura (0, 24, 48 e 72 horas). Os resultados (média \pm DP) foram expressos em absorbância determinada pelo método colorimétrico de MTT. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram calculadas por análise de variância, seguida pelo teste de raios múltiplos de Duncan, quando o F foi significativo ** $p < 0,01$, comparado com o controle (PHA) que não continha qualquer alcalóide.

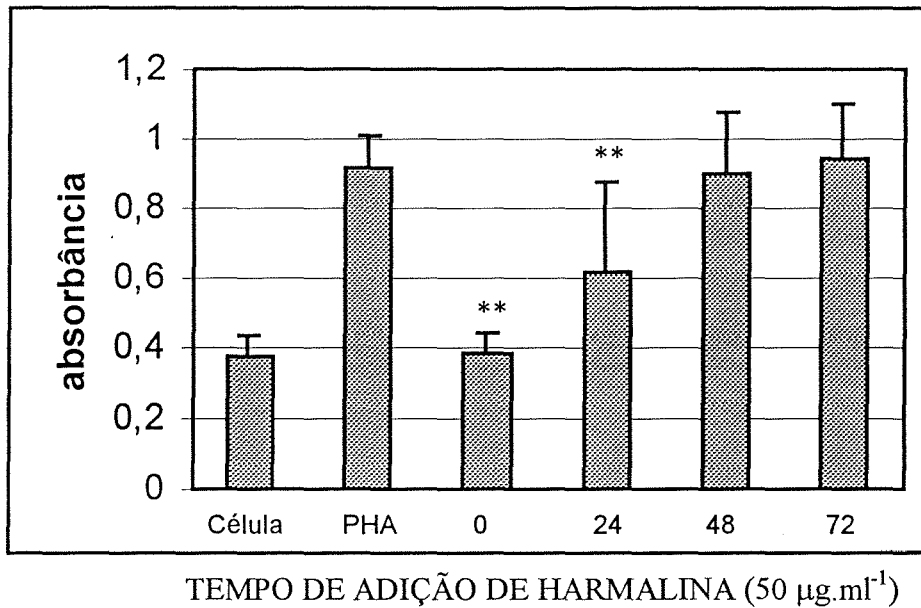


FIGURA IV.9 - Efeito do alcalóide harmalina, adicionado em diferentes tempos de adição das culturas, sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos periféricos humanos estimulados pelo mitógeno fitoemaglutinina. Linfócitos periféricos de 5 doadores foram cultivados durante 96 horas na presença de fitoemaglutinina (1% v/v) com adição do alcalóide (50 µg.ml⁻¹) em diferentes tempos após o início da cultura (0, 24, 48 e 72 horas). Os resultados (média ± DP) foram expressos em absorbância determinada pelo método colorimétrico de MTT. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram calculadas por análise de variância, seguida pelo teste de raios múltiplos de Duncan, quando o F foi significativo ** p<0,01, comparado com o controle (PHA) que não continha qualquer alcalóide.

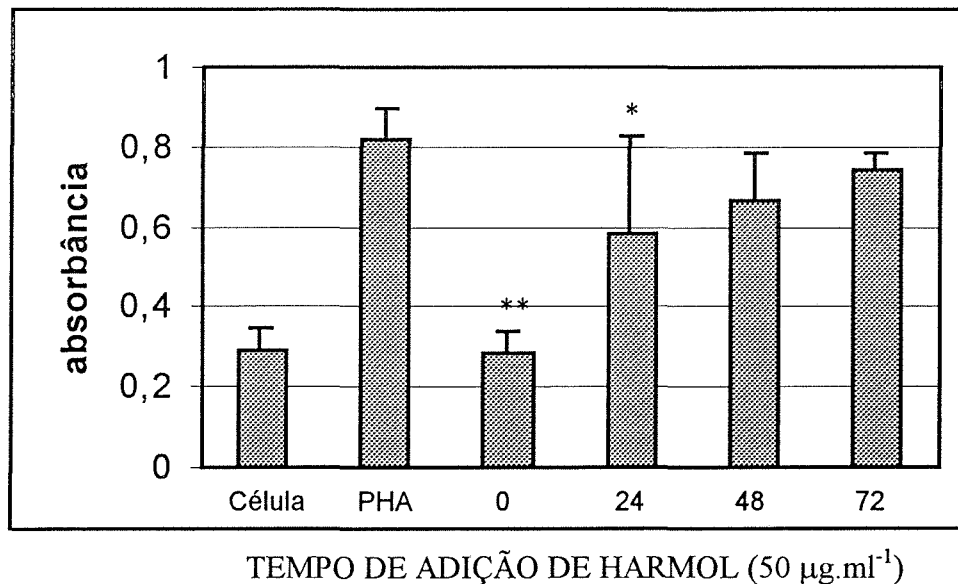


FIGURA IV.10 – Efeito do alcalóide harmol, adicionado em diferentes tempos de adição das culturas, sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos periféricos humanos estimulados pelo mitógeno fitoemaglutinina. Linfócitos periféricos de 5 doadores foram cultivados durante 96 horas na presença de fitoemaglutinina (1% v/v) com adição do alcalóide (50 µg.ml⁻¹) em diferentes tempos após o início da cultura (0, 24, 48 e 72 horas). Os resultados (média ± DP) foram expressos em absorbância determinada pelo método colorimétrico de MTT. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram calculadas por análise de variância, seguida pelo teste de raios múltiplos de Duncan, quando o F foi significativo * p<0,05 e ** p<0,01, comparado com o controle (PHA) que não continha qualquer alcalóide.

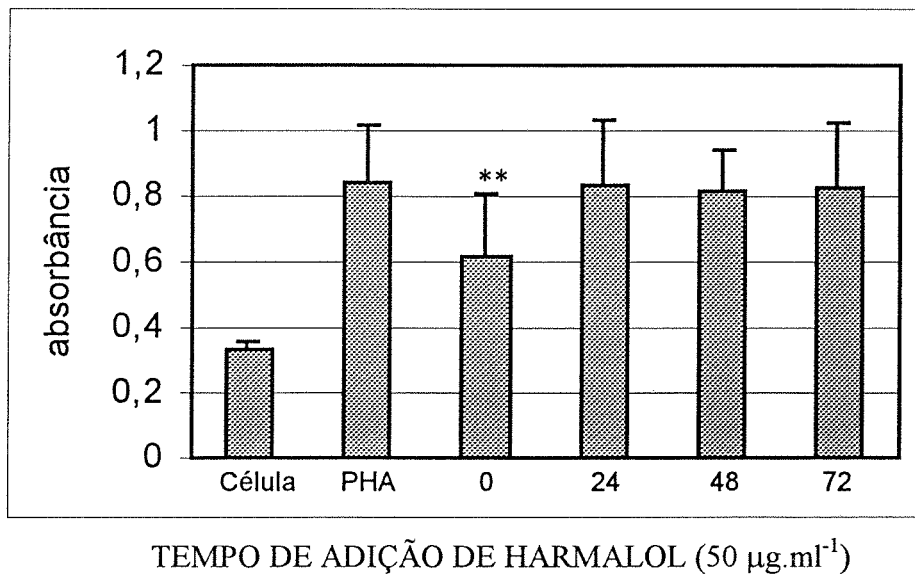


FIGURA IV.11 – Efeito do alcalóide harmalol, adicionado em diferentes tempos de adição das culturas, sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos periféricos humanos estimulados pelo mitógeno fitoemaglutinina. Linfócitos periféricos de 5 doadores foram cultivados durante 96 horas na presença de fitoemaglutinina (1% v/v) com adição do alcalóide (50 µg.ml⁻¹) em diferentes tempos após o início da cultura (0, 24, 48 e 72 horas). Os resultados (média ± DP) foram expressos em absorbância determinada pelo método colorimétrico de MTT. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram calculadas por análise de variância, seguida pelo teste de raios múltiplos de Duncan, quando o F foi significativo ** p<0,01, comparado com o controle (PHA) que não continha qualquer alcalóide.

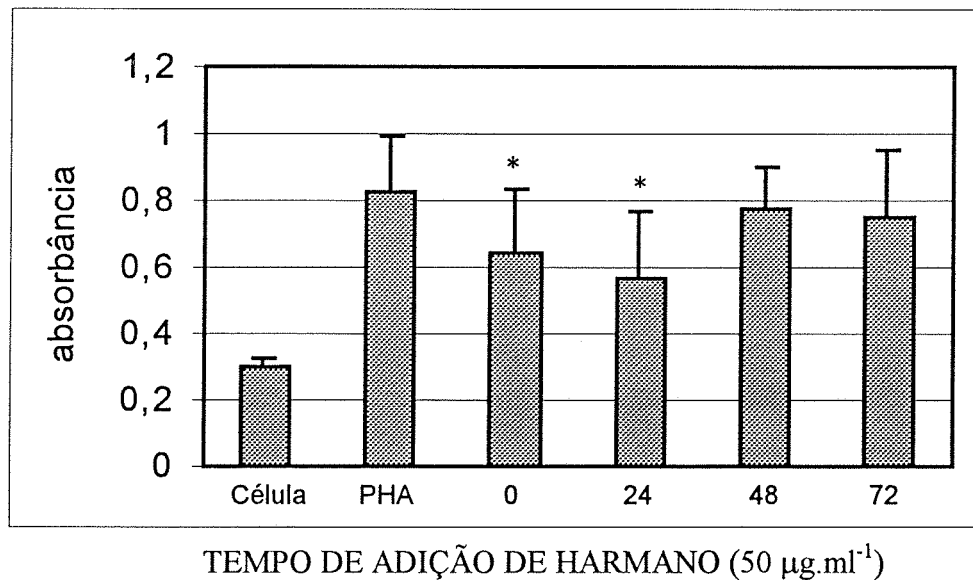


FIGURA IV.12 – Efeito do alcalóide harmina, adicionado em diferentes tempos de adição das culturas, sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos periféricos humanos estimulados pelo mitógeno fitoemaglutinina. Linfócitos periféricos de 5 doadores foram cultivados durante 96 horas na presença de fitoemaglutinina (1% v/v) com adição do alcalóide ($50 \mu\text{g.ml}^{-1}$) em diferentes tempos após o início da cultura (0, 24, 48 e 72 horas). Os resultados (média \pm DP) foram expressos em absorbância determinada pelo método colorimétrico de MTT. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram calculadas por análise de variância, seguida pelo teste de raios múltiplos de Duncan, quando o F foi significativo * $p < 0,05$, comparado com o controle (PHA) que não continha qualquer alcalóide.

TABELA IV.2: Inibição da blastogênese linfocitária provocada pelas beta-carbolinas, quando adicionadas em diferentes períodos após o início das culturas.

Inibição da blastogênese (%)					
Tempo de adição	Harmina	Harmalina	Harmol	Harmalol	Harmano
0	56,72** \pm 0,203	58,3** \pm 0,060	65,45** \pm 0,059	26,46** \pm 0,172	31,19* \pm 0,262
24	63,65** \pm 0,120	32,87** \pm 0,261	28,45* \pm 0,238	1,43 \pm 0,100	12,55* \pm 0,089
48	46,09** \pm 0,204	1,7 \pm 0,173	18,44 \pm 0,118	2,73 \pm 0,069	2,24 \pm 0,089
72	4,26 \pm 0,190	-	8,92 \pm 0,036	2,14 \pm 0,075	9,02 \pm 0,107

Os valores correspondem às médias das percentagens de inibição * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, comparado com as culturas controles (0% de inibição) sem a presença dos alcalóides.

IV.4 Efeito da pré-incubação das beta-carbolinas sobre a resposta celular de linfócitos periféricos humanos estimulados por fitoemaglutinina

A fim de verificar se um contato prévio com os alcalóides causava algum tipo de modificação na capacidade das células responderem ao mitógeno, as células foram pré-incubadas com os alcalóides por 4 horas, após o que as culturas eram processadas normalmente.

As figuras IV.13 a IV.17 mostram o efeito da pré-incubação por 4 horas dos alcalóides, na concentração de $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, sobre a proliferação linfocitária *in vitro*, expressa pela absorbância e determinada pelo teste colorimétrico de MTT. As células mononucleares foram incubadas em cinco condições distintas. Na condição 1 (C1), ocorreu pré-incubação das células por 4 horas com os alcalóides, seguindo-se a adição do mitógeno e o período de incubação de 96 horas. Na condição 2 (C2), após a pré-incubação das células por 4 horas com os alcalóides, as células foram lavadas e adicionadas às culturas na presença do mitógeno. Na condição 3 (C3), as células foram pré-incubadas somente com o meio de cultura por 4 horas; após este período de incubação, os alcalóides e o mitógeno foram suplementados às culturas. Na condição 4 (C4), as células foram pré-incubadas com meio de cultura por 4 horas; após este período, as culturas continham o mitógeno. Finalmente, na condição 5 (C5), as células foram pré-incubadas por 4 horas e posteriormente incubadas somente com o meio de cultura.

Os alcalóides harmina [$F(3, 23) = 86,4761$; $p < 0,01$]; harmalina [$F(3, 23) = 46,8537$; $p < 0,01$], harmol [$F(3, 23) = 13,5893$; $p < 0,01$], harmalol [$F(3, 23) = 19,8176$; $p < 0,01$] e harmano [$F(3, 23) = 15,6626$; $p < 0,01$] foram capazes de inibir a ativação linfocitária nas condições C1, C2 e C3.

Pode-se observar nas figuras IV.13 a IV.17 que apenas a pré-incubação dos linfócitos com os alcalóides (C2) foi suficiente para inibir a proliferação, indicando que os mesmos atuam em um estágio precoce do ciclo celular, não sendo mais necessários após esta fase inicial.

Por outro lado, a presença dos mesmos durante a pré-incubação e a incubação (C1) provocou uma maior inibição, efeito observado com todas as drogas. A adição dos alcalóides somente durante o período de incubação (C3) resultou em uma menor (harmol, harmalol e harmano) (Figuras IV.15, IV.16 e IV.17) ou igual (harmina e harmalina) (Figuras IV.13 e IV.14) inibição do que quando presente em todas as etapas da cultura. A tabela IV.3 sumariza estes resultados.

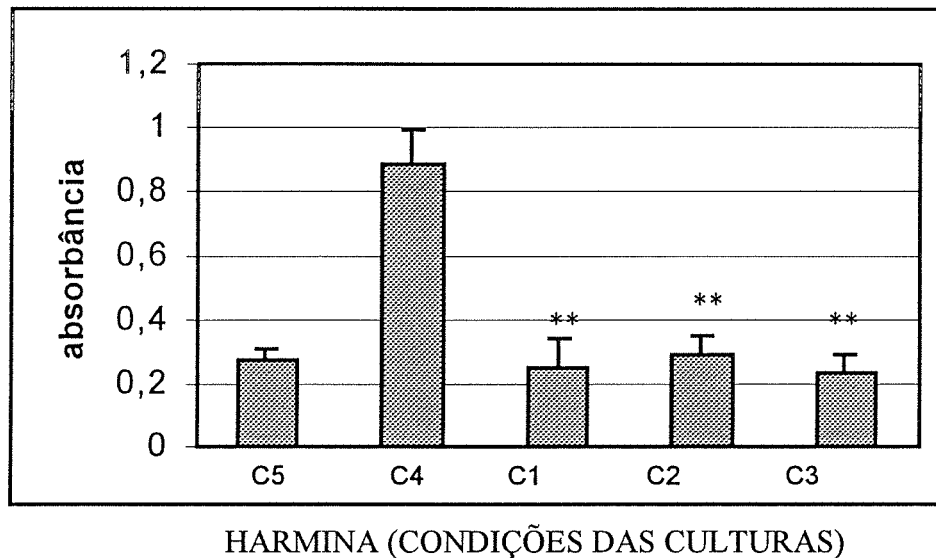


FIGURA IV.13 – Efeito da pré-incubação do alcalóide harmina sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos periféricos humanos estimulados pelo mitógeno fitoemaglutinina. Foram utilizados linfócitos periféricos humanos obtidos de 6 doadores. As células foram pré-incubadas por 4 horas com os alcalóides ou meio de cultura. Após este período, as culturas foram feitas em cinco condições distintas: C1 - pré-incubação por 4 horas das células com o alcalóide; após, adição do alcalóide e do mitógeno; C2 - pré-incubação por 4 horas das células com o alcalóide; após, adição do mitógeno nas células lavadas; C3 - pré-incubação por 4 horas das células com o meio; após, adição do alcalóide e do mitógeno; C4 - pré-incubação por 4 horas das células com o meio; após, adição do mitógeno e C5 - pré-incubação por 4 horas e incubação das células com o meio. Os resultados (média ± DP) foram expressos em absorbância determinada pelo método colorimétrico do MTT. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram calculadas por análise de variância, seguida pelo teste de raios múltiplos de Duncan, quando o F foi significativo ** $p < 0,01$, comparado ao grupo controle (C4), na ausência do alcalóide.

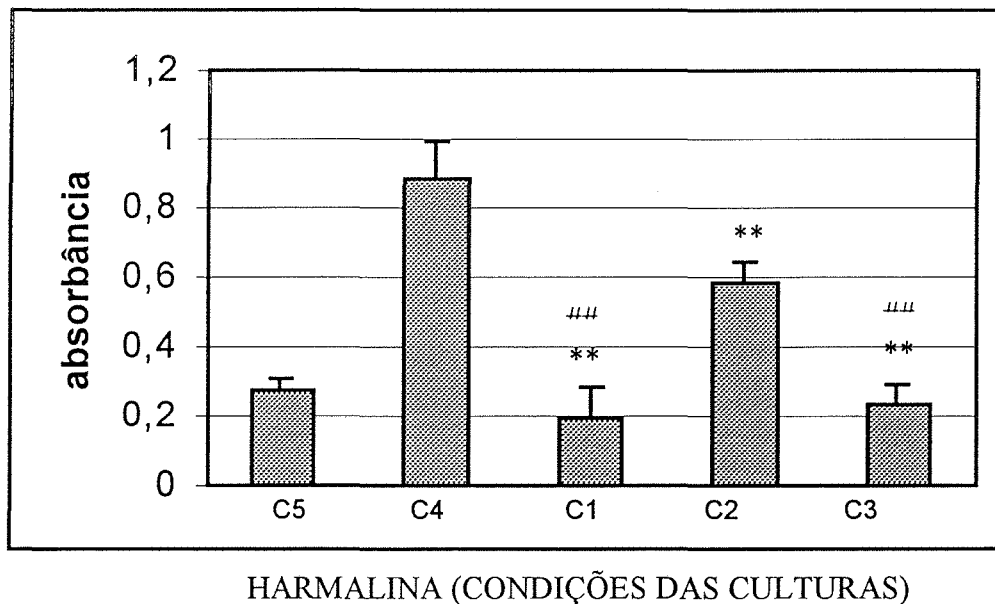


FIGURA IV.14 – Efeito da pré-incubação do alcalóide harmalina sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos periféricos humanos estimulados pelo mitógeno fitoemaglutinina. Foram utilizados linfócitos periféricos humanos obtidos de 6 doadores. As células foram pré-incubadas por 4 horas com os alcalóides ou meio de cultura. Após este período, as culturas foram feitas em cinco condições distintas: C1 - pré-incubação por 4 horas das células com o alcalóide; após, adição do alcalóide e do mitógeno; C2 - pré-incubação por 4 horas das células com o alcalóide; após, adição do mitógeno nas células lavadas; C3 - pré-incubação por 4 horas das células com o meio; após, adição do alcalóide e do mitógeno; C4 - pré-incubação por 4 horas das células com o meio; após, adição do mitógeno e C5 - pré-incubação por 4 horas e incubação das células com o meio. Os resultados (média \pm DP) foram expressos em absorbância determinada pelo método colorimétrico do MTT. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram calculadas por análise de variância, seguida pelo teste de raios múltiplos de Duncan, quando o F foi significativo ** $p < 0,01$, comparado ao grupo controle (C4), na ausência do alcalóide. ## $p < 0,01$ comparado ao grupo C2.

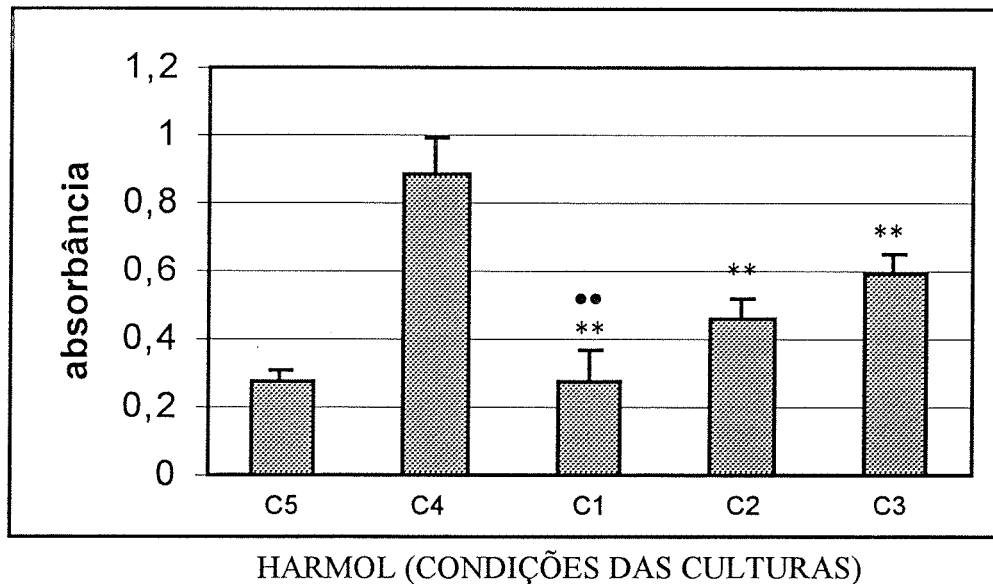


FIGURA IV.15 – Efeito da pré-incubação do alcalóide harmol sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos periféricos humanos estimulados pelo mitógeno fitoemaglutinina. Foram utilizados linfócitos periféricos humanos obtidos de 6 doadores. As células foram pré-incubadas por 4 horas com os alcalóides ou meio de cultura. Após este período, as culturas foram feitas em cinco condições distintas: C1 - pré-incubação por 4 horas das células com o alcalóide; após, adição do alcalóide e do mitógeno; C2 - pré-incubação por 4 horas das células com o alcalóide; após, adição do mitógeno nas células lavadas; C3 - pré-incubação por 4 horas das células com o meio; após adição do alcalóide e do mitógeno; C4 - pré-incubação por 4 horas das células com o meio; após, adição do mitógeno e C5 - pré-incubação por 4 horas e incubação das células com o meio. Os resultados (média \pm DP) foram expressos em absorvância determinada pelo método colorimétrico do MTT. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram calculadas por análise de variância, seguida pelo teste de raios múltiplos de Duncan, quando o F foi significativo ** $p < 0,01$, comparado ao grupo controle (C4), na ausência do alcalóide. •• $p < 0,01$ comparado ao grupo C3.

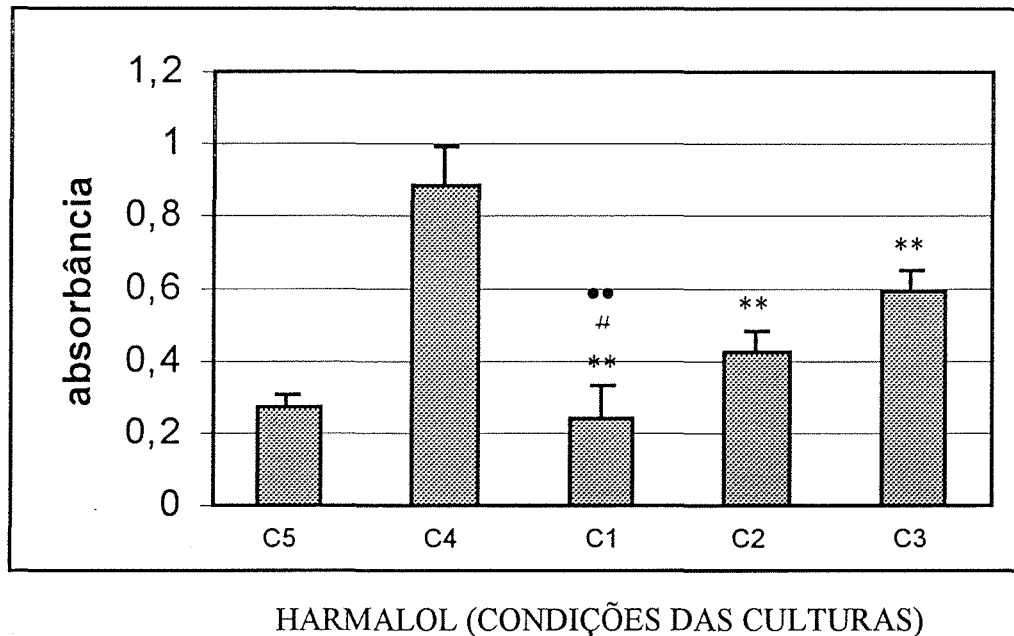


FIGURA IV.16 - Efeito da pré-incubação do alcalóide harmalol sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos periféricos humanos estimulados pelo mitógeno fitoemaglutinina. Foram utilizados linfócitos periféricos humanos obtidos de 6 doadores. As células foram pré-incubadas por 4 horas com os alcalóides ou meio de cultura. Após este período, as culturas foram feitas em cinco condições distintas: C1 - pré-incubação por 4 horas das células com o alcalóide; após, adição do alcalóide e do mitógeno; C2 - pré-incubação por 4 horas das células com o alcalóide; após, adição do mitógeno nas células lavadas; C3 - pré-incubação por 4 horas das células com o meio; após adição do alcalóide e do mitógeno; C4 - pré-incubação por 4 horas das células com o meio; após, adição do mitógeno e C5 - pré-incubação por 4 horas e incubação das células com o meio. Os resultados (média \pm DP) foram expressos em absorbância determinada pelo método colorimétrico do MTT. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram calculadas por análise de variância, seguida pelo teste de raios múltiplos de Duncan, quando o F foi significativo ** $p < 0,01$, comparado ao grupo controle (C4), na ausência do alcalóide; •• $p < 0,01$ comparado ao grupo C3; # $p < 0,05$ comparado ao grupo C2

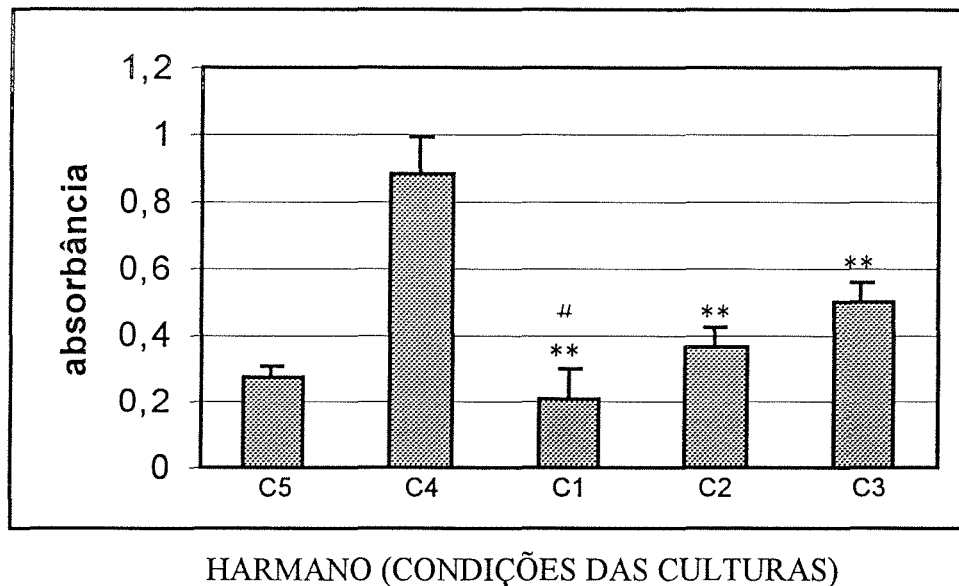


FIGURA IV.17 – Efeito da pré-incubação do alcalóide harmano sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos periféricos humanos estimulados pelo mitógeno fitoemaglutinina. Foram utilizados linfócitos periféricos humanos obtidos de 6 doadores. As células foram pré-incubadas por 4 horas com os alcalóides ou meio de cultura. Após este período, as culturas foram feitas em cinco condições distintas: C1 - pré-incubação por 4 horas das células com o alcalóide; após, adição do alcalóide e do mitógeno; C2 - pré-incubação por 4 horas das células com o alcalóide; após, adição do mitógeno nas células lavadas; C3 - pré-incubação por 4 horas das células com o meio; após adição do alcalóide e do mitógeno; C4 - pré-incubação por 4 horas das células com o meio; após, adição do mitógeno e C5 - pré-incubação por 4 horas e incubação das células com o meio. Os resultados (média ± DP) foram expressos em absorbância determinada pelo método colorimétrico do MTT. As diferenças entre as médias dos vários grupos foram calculadas por análise de variância, seguida pelo teste de raios múltiplos de Duncan, quando o F foi significativo ** $p < 0,01$, comparado ao grupo controle (C4), na ausência do alcalóide; • $p < 0,05$ comparado ao grupo C3.

TABELA IV.3: Influência da pré-incubação das células com os alcalóides sobre a imunossupressão *in vitro*.

Alcalóide	Porcentagem de inibição		
	C1	C2	C3
Harina	71,90** \pm 0,091	67,35** \pm 0,058	73,38** \pm 0,056
Harmalina	78,28** \pm 0,079	34,13** \pm 0,169	73,61** \pm 0,079
Harmol	69,06** \pm 0,048	47,79** \pm 0,221	32,31** \pm 0,227
Harmalol	72,25** \pm 0,244	51,31** \pm 0,428	32,88** \pm 0,590
Harmano	76,68** \pm 0,066	58,37** \pm 0,101	43,35** \pm 0,316

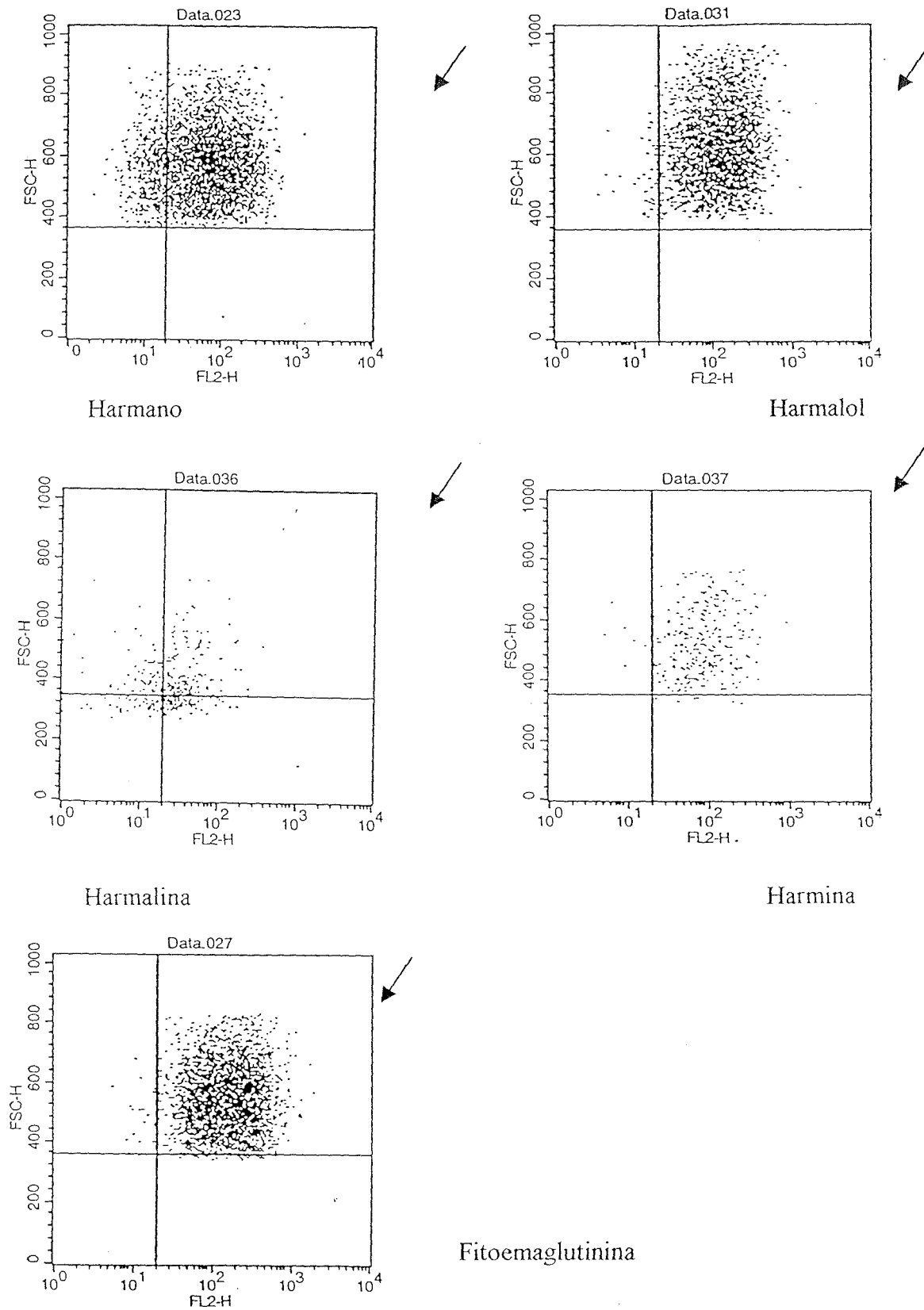
Os valores correspondem a média das percentagens de inibição C4 (0% de inibição) * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, comparadas na ausência dos alcalóides. C1, C2, C3 vide figura IV.13

IV.5 Imunofenotipagem dos tipos celulares presentes nas culturas de linfócitos periféricos.

Devido ao efeito que o cultivo exerce sobre as células, os resultados de citometria foram analisados em janelas que incluíram apenas as células viáveis. Foram utilizados três anticorpos: anti-CD3, anti-CD13 e anti-CD19 que identificam marcadores de superfície de linfócitos T, monócitos e linfócitos B, respectivamente. A figura IV.18 mostra o efeito dos alcalóides harmano, harmalol, harmalina e harmalina sobre a proliferação dos linfócitos T (CD3). A ordem decrescente da inibição da proliferação linfocitária foi harmalina, harmina, harmalol e harmano.

O harmol não está mostrado na figura pois o número de células presentes na cultura não foi suficiente para a análise por citometria de fluxo (o mais potente imunossupressor).

Figura IV.18: Citometria de fluxo das culturas de linfócitos T (CD3) estimulados por PHA na presença ou ausência (controle) dos alcalóides.



As setas indicam a janela correspondente aos linfócitos marcados com anticorpo anti-CD3 (linfócitos T).

V. DISCUSSÃO

Os alcalóides indólicos pertencentes à família das beta-carbolinas são também conhecidos como alcalóides da harmala por terem sido inicialmente descritos na planta *Peganum harmala* (Zygophyllaceae). Desde então, as beta-carbolinas foram descritas em 23 famílias de angiospermas. Na América do Sul, os índios utilizam partes da planta *Banisteriopsis caapi* para a produção de uma bebida conhecida como yage (Colômbia), ayahuasca (Equador) ou caapi (Brasil). Esta bebida possui alto poder alucinógeno e alguns pesquisadores acreditam que a interação das beta-carbolinas com o sistema nervoso central seja semelhante ao mecanismo de ação do ácido lisérgico, o qual também pertence à classe dos alcalóides indólicos (Naranjo, 1967).

Existem indicativos de que as beta-carbolinas se formem endogenamente em mamíferos, pois a conformação estrutural encontrada nas plantas é diferente da encontrada em vários líquidos biológicos, tecidos e células de mamíferos, mais especificamente em plaquetas, leite, urina, plasma, fígado, cristalino e cérebro (Dillon *et alli.*, 1976; Bidder *et alli.*, 1979; Airaksinen *et alli.*, 1981; Iizuka e Yajima, 1993; Meester, 1995). As beta-carbolinas também são encontradas na fumaça do cigarro, bebidas alcoólicas tais como o vinho, o uísque e o saquê e na carne quando excessivamente cozida (Poindexter e Carpenter, 1962, Allen e Holmestdt, 1980; Meester, 1995). A interação destes alcalóides com o sistema nervoso central tem sido relacionada com a capacidade destes alcalóides em inibir de forma reversível a ação da enzima monoamina oxidase A (MAO A) (Rommelspacher *et alli.*, 1991; Callaway, 1993; Rommelspacher *et alli.*, 1994; Fernandez de Arriba *et alli.*, 1994; May *et alli.*, 1994; Kim *et alli.*, 1997;).

Existem ainda relatos da indução de tremores em gatos, macacos e camundongos após a administração das beta-carbolinas e de hipotermia em ratos devido a interação das beta-carbolinas com o sistema nervoso central (Lamarre *et alli.*, 1971; Airaksinen *et alli.*, 1987; Kawanishi *et alli.*, 1994).

A ação dos alcalóides no sistema imune tem despertado o interesse de vários pesquisadores. No nosso grupo foram estudados os alcalóides yoimbina, corinantina e berberina que apresentaram atividade imunossupressora em células T humanas e murinas (Ckless *et alli.*, 1995, 1996). Em outros trabalhos tem sido mostrado o efeito imunossupressor de outros alcalóides, como é o caso da morfina, nicotina e vincristina (Sutton *et alli.*, 1997; Niitsu e Umeda, 1997; Geng *et alli.*, 1995; Zhang e Petro, 1996).

As beta-carbolinas harmina, harmalina, harmol, harmalol, harmano e noraharmano são considerados agentes co-mutagênicos, pois na presença de ativação metabólica (S-9) apresentam um grau variável de mutagenicidade. Estudos clastogênicos demonstraram a ação das beta-carbolinas na indução de aberrações cromossômicas em células CHO (*Chinese Hamster Ovary*), na troca entre cromátides irmãs em células CHO e linfócitos periféricos humanos e mutações por mudança no quadro de leitura em bactérias. Além disso, foi demonstrado que estes alcalóides possuem a capacidade de formar pontes covalentes no DNA (monoadição) em camundongos e induzir funções SOS em bactérias (Abe e Sasaki, 1975; Madle *et alli.*, 1981; Takehisa e Kanaya, 1982; Yamashita *et alli.*, 1988; Oda *et alli.*, 1988; Dillehay *et alli.*, 1989; Burns e Bottino, 1989; Sasaki *et alli.*, 1992; Sasaki e Shirasu, 1993; Picada *et alli.*, 1997).

Os alcalóides pertencentes a família das beta-carbolinas estudados no presente trabalho são divididos em dois grupos, conhecidos como beta-carbolinas aromáticas e diidro-beta-carbolinas. Estes dois grupos são caracterizados pela presença de um grupo indólico e um anel piridínico hidrogenado, onde os substituintes variam de acordo com o alcalóide. As beta-carbolinas aromáticas harmina, harmol e harmano possuem o anel piridínico insaturado e as diidro-beta-carbolinas harmalina e harmalol possuem o anel piridínico insaturado (Allen e Holmstedt, 1980) (Figura I.1).

A proliferação linfocitária em resposta a mitógenos tem sido um instrumento muito útil para se avaliar a imunidade celular de indivíduos suspeitos de imunossupressão. Para tal, medidas de proliferação linfocitária como a incorporação de timidina no DNA celular (du Blois, 1973) e o teste do MTT (Loveland, 1992) são rotineiramente utilizadas para a avaliação da imunidade celular. Assim, a suspeita de imunidade deprimida em um indivíduo pode ser testada pela verificação da proliferação de seus linfócitos quando estimulados *in vitro* por mitógenos. Uma outra finalidade para os testes de proliferação linfocitária é a pesquisa de atividades imunorregulatórias em compostos químicos. Estes compostos são colocadas em culturas de linfócitos de indivíduos normais e sua ação sobre a blastogênese celular estimulada por mitógenos medida.

Neste estudo foram analisados os efeitos de cinco alcalóides pertencentes a família das beta-carbolinas (harmina, harmalina, harmol, harmalol e harmano) sobre a proliferação *in vitro* de células mononucleares estimuladas por fitoemaglutinina,

visando a identificação de possíveis propriedades imunomoduladoras. E foi utilizado o alcalóide cafeína como controle das culturas.

Foram utilizadas concentrações dos alcalóides nas culturas variando entre 3 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e a concentração do mitógeno fitoemaglutinina (PHA) de 1% (Ckless *et alli.*, 1995, 1996). As microculturas continham 10% de plasma autólogo e 160.000 células em um volume final de 200 μl . Os linfócitos foram incubados por 96 horas a 37° C em uma atmosfera de 5% de CO₂ em ar. Para verificar a viabilidade celular, foi usado o teste de azul de tripan. A proliferação celular foi medida através do ensaio de MTT (Sladowski *et alli.*, 1993).

Todas as beta-carbolinas estudadas apresentaram uma atividade imunossupressora *in vitro*, diminuindo significativamente a blastogênese celular nas doses de 50 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Já o harmol apresentou um efeito maior, uma vez que apresentou sua ação na dose de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tendo em vista que a cafeína não causou qualquer alteração na proliferação linfocitária, é provável que a ação dos alcalóides harmina, harmalina, harmol, harmalol e harmano tenha sido uma ação específica desta família de compostos que tem uma estrutura química comum.

Já foi demonstrado que as beta-carbolinas possuem a capacidade de se intercalar ao DNA de células mamíferas e de bactérias e tem sido proposto que esta intercalação pode ser a responsável pelas atividades co-mutagênicas e clastogênicas (Hayashi *et alli.*, 1977; Meester, 1995).

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram a ação imunossupressora de vários aminoácidos, entre eles o triptofano, sobre a proliferação de linfócitos periféricos humanos (Sommer *et alli.*, 1994). O triptofano causou a maior inibição da proliferação comparativamente aos outros aminoácidos, mas não tínhamos uma explicação para tal fato. Considerando-se que nas plantas as beta-carbolinas são derivadas do triptofano e que o grupo indólico deste aminoácido é mantido, provavelmente a ação das beta-carbolinas e do triptofano sobre os linfócitos periféricos humanos ocorra através deste grupo indólico. Portanto, é possível que o grupo indólico destas moléculas afins seja a parte da molécula responsável pela sua intercalação no DNA. E que este seja o mecanismo responsável pela inibição da reatividade linfocitária causada por estes compostos.

A atividade imunossupressora do triptofano e das beta-carbolinas e a semelhança estrutural destes alcalóides com este aminoácido podem ser de grande

importância para o desenvolvimento pelas indústrias farmacêuticas de drogas estruturalmente semelhantes, com algumas nuances (radicais) que intensificariam sua ação imunossupressora para que possam ser utilizados para o tratamento de doenças autoimunes ou rejeições.

A seguir, foi verificado que os alcalóides harmano, harmina e harmol possuíam ação citotóxica na dose de $100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, enquanto a harmalina foi citotóxica nas doses de 50 e $100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Já o harmalol não causou citotoxicidade em todas as doses testadas. Portanto, descarta-se a possibilidade de citotoxicidade como causa de inibição da proliferação celular causada pelos alcalóides harmano, harmina, harmol e harmalol, com exceção da harmalina, cujo efeito citotóxico na dose de $50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ possa estar associado ao seu efeito imunossupressor *in vitro*.

Em outros experimentos os alcalóides harmina, harmalina, harmol, harmalol e harmano foram adicionados às culturas nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas após o início das mesmas. Os alcalóides mostraram uma atividade imunomodulatória variável dependente do momento em que eram colocados em contato com as células mononucleares. Nenhum dos alcalóides foi capaz de causar inibição linfocitária após 72 horas do início da cultura, o que implica dizer que sua ação ocorre mais precocemente do início do cultivo celular. O harmalol e o harmano inibiram a proliferação linfocitária apenas quando suplementados no início (tempo 0) das culturas, refletindo uma ação muito precoce no ciclo celular. A harmina mostrou-se o alcalóide menos dependente de tempo, pois até 48 horas após o início das culturas foi capaz de causar inibição na atividade linfocitária, o que representa uma ação sobre vários estágios (iniciais e intermediários) das culturas. Já o harmol e a harmalina apresentaram uma ação intermediária, pois inibiram a proliferação linfocitária até 24 horas após o início da cultura. Não se pode descartar, ao menos para a harmalina uma ação citotóxica.

Nos estudos realizados com pré-incubação, foi verificado que um contato prévio com as células por 4 horas já é suficiente para as beta-carbolinas estudadas, na concentração de $50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ exerçam a sua ação imunomodulatória *in vitro*, mesmo que após sejam retiradas do meio de cultura (C2). Tais resultados indicam uma ação fundamental dos alcalóides no início do ciclo celular sobre os linfócitos periféricos humanos. Por outro lado, a beta-carbolinas com o radical metoxila (O-CH₃) ligado ao grupo indólico (harmina e harmalina) apresentam padrão semelhante da resposta

linfocitária, ou seja, uma maior inibição da resposta linfocitária ocorreu quando estes alcalóides estavam presentes durante toda a cultura ou quando foram adicionados após a pré-incubação (Figuras III.13 e III.14). Já para os alcalóides harmol e harmalol que possuem o radical hidroxila (OH) e para o harmano que não possui substituinte nesta posição (C-7), também ocorreu efeito semelhante no que se refere a seu efeito imunossupressor (Figuras III.15, III.16 e III.17), em que sua maior atividade imunossupressora *in vitro* ocorreu quando estavam presentes durante toda a cultura. Estes alcalóides apresentam um efeito menor quando adicionados após a pré-incubação. É, portanto, possível que a diferença do perfil de proliferação linfocitária observado nos alcalóides seja devido aos distintos substituintes

Os estudos com citometria de fluxo confirmaram o efeito inibitório destes alcalóides sobre a blastogênese celular e indicaram que sua ação está dirigida para os linfócitos T (CD3+).

Em outros estudos com os mesmos alcalóides da harmala foi verificado que a presença da hidroxila como substituinte (harmol e harmalol) diminui a atividade genotóxica e citotóxica (Picada *et alli.*, 1997)

Concluindo, acreditamos que as beta-carbolinas investigadas no presente trabalho, o triptofano e compostos estruturalmente semelhantes, devam ser melhor estudados quanto à sua ação imunomodulatória através de outros testes *in vitro* que determinem as diferentes funções da resposta linfocitária e também em estudos *in vivo* inicialmente experimentais que possam confirmar os achados *in vitro* do presente estudo. Deve-se enfatizar, porém, que os resultados encontrados na proliferação linfocitária em relação a harmalina possam ter ocorrido devido à sua ação citotóxica. Por outro lado, o harmalol não apresentou qualquer atividade citotóxica e parece também não possuir atividade genotóxica nas concentrações (50 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), o que o indica como um potencial agente imunossupressor para estudos futuros.

Caso sejam confirmados os resultados deste estudo, adicionam-se à lista de imunossupressores potentes uma nova categoria de compostos químicos as beta-carbolinas. Neste particular, a síntese de compostos estruturalmente semelhantes às beta-carbolinas e ao triptofano que possuam atividades imunossupressoras maiores, por parte das indústrias farmacêuticas certamente seria útil no tratamento de várias doenças.

VI. RESUMO

Os alcalóides indólicos beta-carbolinas foram inicialmente descritos por Goebel em 1841 a partir da planta *Peganum harmala*. Estes alcalóides são conhecidos por apresentarem ações sobre o sistema nervoso central, inibindo a enzima monoamino oxidase, sobre o sistema cardiovascular, causando hipotensão e bradicardia e sobre o DNA, intercalando-se entre as bases que o compõem, o que explicaria a ação co-mutagênica e clastogênica dos mesmos. No presente estudo, foi investigada a influência de cinco alcalóides das beta-carbolinas (harmina, harmalina, harmol, harmalol e harmano) sobre a proliferação de linfócitos periféricos humanos estimulados com fitoemaglutinina (PHA), um teste *in vitro* para a determinação da imunocompetência celular. As células mononucleares (linfócitos) obtidas de sangue venoso periférico de voluntários hígidos foram cultivados no meio de cultura RPMI 1640 em microplacas de 96 poços com fundo plano a 37° C por 96 horas na presença de 5% de CO₂ em ar na presença de 1% de fitoemaglutinina, 10 % de soro autólogo e de cada um dos alcalóides nas concentrações de 3 a 100 µg.ml⁻¹, em alguns experimentos e na concentração de 50 µg.ml⁻¹ em outros. As culturas controles não continham nenhum alcalóide. O método de MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) foi utilizado para verificar a proliferação celular. Todos as cinco beta-carbolinas foram capazes de inibir a proliferação celular nas doses de 50 e 100 µg.ml⁻¹, enquanto o harmol também apresentou efeito imunossupressor nas doses de 25 µg.ml⁻¹. Já o alcalóide utilizado como controle, a cafeína, não apresentou qualquer efeito sobre a reatividade linfocitária o que indica uma ação específica dos alcalóides da harmala. Quando os alcalóides foram adicionados em diferentes tempos a partir do início das culturas (0, 24, 48 e 72 horas) foi detectada uma atividade imunoregulatória variável sobre os linfócitos estimulados por fitoemaglutinina. Nenhum alcalóide causou inibição na proliferação após 72 horas do início das culturas, o que indica uma ação imunomoduladora nos estágios iniciais da cultura celular. Os alcalóides harmalol e harmano inibiram a proliferação somente no tempo 0 hora do início das culturas. A harmina mostrou-se a menos dependente de tempo, pois até 48 horas após o início das culturas causou inibição da proliferação linfocitária. Já o harmol e a harmalina apresentaram um mecanismo de ação intermediário, pois causaram inibição até 24 horas após o início das culturas.

Todos os alcalóides das beta-carbolinas foram capazes de inibir a proliferação linfocitária quando pré-incubados por 4 horas e após retirados do meio de cultura, refletindo a ação destes nos estágios precoces da proliferação linfocitária. A harmina e a harmalina apresentaram a maior inibição da resposta linfocitária quando se mantiveram presentes durante todo o período da cultura ou quando foram adicionados após a pré-incubação. O mesmo ocorreu para os alcalóides harmol, harmalol e harmano quando presentes durante toda a cultura. Eles apresentaram efeito menor quando adicionados somente após a pré-incubação. Os estudos com citometria de fluxo confirmaram o efeito inibitório dos alcalóides indicando que sua ação está dirigida para os linfócitos (CD3+).

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARONS, D.H.; ROSSI, G.V.; ORZECOWSKI, R.F. (1977) Cardiovascular actions of three harmala alkaloids: harmine, harmaline, and harmalol. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66(9):1244-1248
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. (1997) Cellular and molecular immunobiology. 2 ed. Harcourt Brace International Edition/ Saunders
- ABE, S. & SASAKI, M.; (1975) Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals. *J. Natl. Cancer Inst*, 58: 1635-1641
- ABRAHAM, H.D. & MAMEM, A. (1996) LSD-like panic risperidone in post-LSD visual disorder. *Journal Clin Psychopharmacol*, 16(3): 238-241
- ADELL, A. & MYERS, R.D. (1995) 5-HT, dopamine, norepinephrine, and related metabolites in brain of low alcohol drinking (LAD) rats shift after chronic intra-hippocampal infusion of harman. *Neurochemical Research*, 20(2): 209-215
- AIRAKSINEN, M.M. & KARI, I. (1981) β -carbolines, psychoactive compounds in the mammalian body. *Medical Biology*, 59:21-34
- AIRAKSINEN, M.M.; LECKLIN, A.; SAANO, V.; TUOMISTO, L.; GYNTER, J. (1987) Tremorigenic effect and inhibition of tryptamine and serotonin receptor binding by beta-carbolines. *Pharmacol Toxicol*, 60:5-8
- ALLEN, J.R.F. & HOLMSTEDT, B.R. (1980) The simple β -carbolines alkaloids. *Phytochemistry*, 19: 1573-1582
- BECK, B.; JERNSTRÖM, O.; MARTINEZ, M.; REPKE, D.B. (1988) In vitro study of the aromatic hydroxylation of 1-methyle-tetrahydro- β -carboline (meth-tryptoline) in rat. *Chem. Biol. Interact*, 65: 97-106
- BEGUM, S.; USMANI, S.B.; SIDDIQUI, B.S.; SAEED, S.A.; FARNAZ, S.; KHAN, K.A.; KHAN, S.A.; KHALID, S.M.; ZIA, A. (1996) Chemistry and biological activity of a tryptamine and β -carboline series of base. *Drug Research*, 46(II),12: 1163-1168
- BIDDER, T.G.; SHOEMAKER, D.W.; BOETTGER, H.G.; EVANS, M.; CUMMINS, J.T. (1979) Harman in human platelets. *Life Sciences*, 25: 157-164
- BURNS, G. W. & BOTTINO, P.J. Genética. Ed. Guanabara Koogan S.A. 6ª ed. 381 p.il., 1989
- BOISSET, M.; BILLAUD, C.; DESJEUX, J.-F. (1994) Studies on the mechanism of intestinal passage of the food comutagen harman, in the rabbit. *Fd Chem. Toxicol.*, 32(4): 349-356
- BOYUM, A. (1968) Separation of leucocytes from human blood: Further observation. *Scandd. J. Clin. And Lab. Invest*, 21: 31-50

- BOWEN, D.; SOUTHERLAND, W.M.; BOWEN, C.D.; HUGHES, D.E. (1997) Interaction of swainsonine with lymphoid and highly perfused tissues: a pharmacokinetics explanation for sustained immunomodulation. *Anticancer Research*, 17(6D): 4345:4346
- BROOKS, K.H. & VITETTA, E.S. (1987) Activation of murine B cells with *Salmonella typhimurium* mitogen (STM), lipopolysaccharide (LPS), and dextran sulfate (DxS). I. Cell-cycle analysis and induction of cytoplasmic immunoglobulin. *J Mol Cell Immunol* 1987;3(4):215-9
- CALLAWAY, J.C. (1993) Tryptamines, b-carbolines and you. *MAPS Summer* 4(2): 30-32
- CKLESS, K.; SCHLOTTFELDT, J.L.; PASQUAL, M.; MOYNA, P.; HENRIQUES, J.A.P.; WAJNER, M. (1995) Inhibition of in-vitro lymphocyte transformation by the isoquinoline alkaloid berberine. *Journal Pharm. Pharmacol.*, 47: 1029:1031
- CKLESS, K.; SCHLOTTFELDT, J.L.; HENRIQUES, J.A.P.; PERES, A.; NARDI, N.; WAJNER, M. (1996) Reduction of mitogen induced responsiveness of human and murine leukocytes in vitro by yohimbine and corynanthine. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 9(2): 59-65
- COSTA, A.F. (1993) Farmacognosia Vol II. 2 ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa
- DILLEHAY, L. B.; JACOBSON-KARM, D.; WILLIAMS, J. R. (1989) Dna topoisomerases and models of sister-chromatid exchange. *Mutation Research*, 215: 15-23
- DILLON, J.; SPECTOR, A.; NAKANISHI, K. (1976) Identification of β carbolines isolated from fluorescent human lens proteins. *Nature*, 259:422-423
- DUBLOIS, M.J.G.J.; HUSMANS, D.R.; SCHELLEKENS, P.Th.A.; EIJSVOGEL, V.P. (1973) Investigation and standardization of the conditions for micro-lymphocyte cultures. *Tissue Antigens*, 3: 402-409
- DUPORTAIL, G. (1981) Linear and circular dichroism of harmine and harmaline interacting with DNA. *International Journal of Biological Macromolecules. Structure, function and interactions*, 3(3): 188-193
- DUPORTAIL, G.& LAMI, H. (1975) Studies of the interaction of the fluorophores harmine and harmaline with calf thymus DNA. *Biochemical Biophysical Acta*, 402: 20-30
- EINAT, M.; LISHNER, M.; AMIEL, A. NAGLER, A.; YARKORLI, S.; RUDI, A.; KASHMAN, Y.; MARKEL, D.; FABIAN, I. (1995) Eilatin: a novel marine alkaloid inhibit in vitro proliferation of progenitor cells in chronic myeloid leukemia patients. *Exp Hematol*, 23: 1439-1444

- EL-SAAD & EL-RIFAIE,M. (1980) *Peganum harmala*: its use in certain dermatoses. *International Journal of Dermatology*, 19(4): 221-222
- FELTON, J.S.; MALFATTI, A.; KNIZE, M.G.; SALMON, C.P.; HOPMANS, E.C.; WU,R. W. (1997) Health risks of heterocyclic amines. *Mutation Research*, 376: 37-41
- FERNANDEZ DE ARRIBA, A.; LIZCANO, J.M.; BALSAS, M.D.; UNZETA, M. (1994) inhibition of monoamine oxidase from bovine retina by beta-carbolines. *J. Pharmacol*, 46: 809-813
- FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.R.; MACKAY, B.E. (1996) Feeding of potato, tomato and eggplant alkaloids effects food consumption and body and liver weights in mice. *Journal Nutrion*, 126(4): 989-999
- FUJINO, T.; FUJIKI, H.; NAGAO, M.; YAHAGI, T.; SEINO, Y.; SUGIMURA, T.; (1978) The effect of noraharman on the metabolism of benzo[a]pyrene by rat-liver microsomes in vitro in relation to its enhancement of the mutagenicity of benzo[a] pyrene. *Mutation Research*, 58:151-158
- FUTUYMA, D. (1995) *Biologia Evolutiva*. 2 ed. Sinauer Associates, Inc.
- GALLO, G.G. (1987) *Plantas toxicas para elganado en el cono Sur de America*. Hemisferio Sur
- GENG, Y.; SAVAGE, S.M.; JOHNSON, L.J.; SEAGRAVE, J.; SOPORI, M.L. (1995) Effects of nicotine on the immune response. I. Chronic exposure to nicotine impairs antigen receptor-mediated signal transduction in lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 135(2): 268-278
- GERHARDSSON DE VERDIER, M.; HAGMAN, U.; PETERS, R.K.; SEINECK, G.; OVERVIK, E.; (1991) Meat, cooking method and colorectal cancer: A case referent study in stockholm. *International Journal of Cancer*, 49: 520-522
- GLENNON, R.A.; (1981) Serotonin receptor interactions of harmaline and several related β -carbolines *Life Science*, 29: 861-865
- GLENNON, R.A.; (1996) Classical hallucinogens. In: SHUSTER, C.R.; KUHAR, M.J. (Eds.), *Pharmacological Aspects of Drug Dependence*, Springer, Berlin : 343-371
- GOSS, P.E.; BAKER, M.A.; CARVER, J.P.; DENNIS, J.W. (1995) Inhibitors of carbohydrate processing: A new class of anticancer agents. *Clinical Cancer Research*, 1(9): 935-944
- GOSS, P.E.; REID, C.L.; BAILEY, D.; DENNIS, J.W. (1997) Phase IB clinical trial of the oligossacharide processing inhibitor swainsonine in patients with advanced malignancies. *Clinical Cancer Research*, 3(7): 1077-1086

- GRELLA, B.; DUKAT, M.; YOUNG, R.; TEITLER, M.; HERRICK-DAVIS, K.; GAUTHIER, C.; GLENNON, R. A. (1998) Investigation of hallucinogenic and related β -carbolines. *Drug and Alcohol Dependence*, 50: 99-107
- GUYNTHNER, J.; LAPINJOKI, S.P.; AIRAKSINEN, M.M.; PEURA, P. (1986) Decarboxylation of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-1-carboxylic acids in brain homogenate and catalysis by pyridoxal-5'-phosphate. *Biochem. Pharmacol.*, 35: 2671-2675
- HASHIMOTO, Y.; KAWANIDHI, K.; MORIASU, M. (1988) Forensic chemistry of alkaloids. In: the alkaloids. Chemistry and Pharmacology. San Diego: Academic Press, V32 Cap1: 40-45
- HASHIMOTO, T. & YAMADA, Y. (1994) Alkaloid biogenesis: molecular aspects. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 45: 257-285
- HAYASHI, K.; NAGAO, M.; SUGIMURA, T. (1977) Interactions of norharman and harman with DNA. *Nucleic Acids Research*, 4(11): 3679-3685
- HILBURGER, M.E.; ADLER, M.W.; ROGERS, T.J.; EISENSTEIN, T.K. (1997) Morphine alter macrophage and lymphocyte populations in the spleen and peritoneal cavity. *Journal of Neuroimmunology*, 80(1-2): 106-114
- HUDSON, J.B.; GRAHAM, E.A.; FONG, R.; HUDSON, L.L.; TOWERS, G.H.N. (1986) Further studies on the antiviral activity of harmine, a photoactive β -carboline alkaloid. *Photochemistry and Photobiology*, 44 (4):483-487
- IIZUKA, H. & YAJIMA, T.(1993) Fluorometric determination of L-tryptophan with methoxyacetaldehyde. *Biol Pharm Bull*, 16(2): 103-106
- JANEWAY, C. Jr & TRAVERS, P. (1997) Immunobiology: the immune system in health and disease. 2 ed.Current Biology, Garland
- JONES, A.L. & MILLAR, J.L. (1989) Growth factor in haemopoiesis. *Baillieres Clin Hematol*, 2(1): 83-111
- KARLIX, J.L.; BEHNKE, M.; DAVIS-EYLER, F.; WOBIE, K.; ADAMS, V.; FREIBURGER, B.; CONLON, M.; TEBBETT, I.R. (1998) Cocaine suppresses fetal immune system. *Pediatr Res*, 44(1): 43-46
- KAWANISHI, K.; EGUCHI, N.; HAYASHI, T.; HASHIMOTO, Y.(1994) Relationship between occurrence of tremor/convulsion and level of beta-carbolines in the brain after administration of beta-carbolines into mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 47(3): 689-699
- KIM, H.; SABLIN, S.O.; RAMSAY, R.R. (1997) Inhibition of Monoamine oxidase A by β -carboline derivatives. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 337(1):137-142

- KONNO, S.; ORONSKY, B.T.; SEMPRONI, A.R.; WU, J.M. (1991) The effect of nicotine on cell proliferation and synthesis of secreted proteins in BALB/C 3T3 cells. *Biochem Int.*, 25(1):7-17.
- LAMARRE, Y. & MERCIER, L. (1971) Neurophysiological studies of harmaline-induced tremor in the cat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 49: 1049-1058
- LEVITT, R.C.; LEGRAVEREND, C.; NEBERT, D.W.; PELKONEN, O. (1977) Effect on the mutagenicity and binding to DNA of benzo[a]pyrene metabolites in vitro and on aryl hydrocarbon hydroxylase induction in cell culture. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 79: 1167:1175
- LOVELAND, B.E.; JOHNS, T.G.; MACKAY, I.R.; VALLANT, F.; WANG, Z.-X.; HERTZOD, P.J. (1992) Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays. *Biochemistry Int. L.*, 27(3): 501-510
- LU, Z.W.; DAI, W.J; WANG, G.L.; LIN, Z.B. (1996) Subchronic in vivo treatments of morphine inhibit T-cell proliferation by acting on macrophages. *Brain Behav Immunology*, 10(4):351-363
- LUNA, L.E. (1984) The healing practices of a Peruvian Shaman. *J. Ethnopharmacol*, 11(2): 123-133
- MACKENNA. D.J.; TOWERS, G.H.; ABBOTT, F. (1984) Monoamina oxidase inhibitors in South America hallucinogenic plants: tryptamine and beta-carbolines constituents of ayahuasca. *J. Ethnopharmacol*, 10(2): 195-223
- MADLE, E.; OBE, G.; HANSEN, J.; RISTOW, H. (1981) Harman and noraharman: induction of sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes in vitro and interaction with isolated DNA. *Mutation Research*, 90: 433-442
- MAREK, G.J. & AGHAJANINA, G.K. (1996) LSD and phenethylamine hallucinogen DOI are potent partial agonists at 5-HT_{2A} receptors on interneurons in rat piriform cortex. *J Pharmacol Exp Ther*, 278(3): 1373-1382
- MATSUBARA, K.; GONDA, T.; SAWADA, H.; UEZONO, T.; KOBAYASHI, Y.; KAWAMURA, T.; OHTAKI, K.; KIMURA, K.; AKAIKE, A. (1998) Endogenously occurring β -carboline induces Parkinsonism in nonprimate animals: a possible causative protoxin in idiopathic Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 70(2): 727-735
- MAY, T.; GREUBE, A.; STRAUSS, S.; HEINEKE, D.; LEHMANN, J.; ROMMESLSPACHER, H. (1994) Comparison of the in vitro binding characteristics of the β -carbolines harman and noraharman in rat brain and liver and in bovine adrenal medulla. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 349(3): 308-317

- MEESTER, C. (1995) Genotoxic potential of β -carbolines: a review. *Mutation Research*, 339: 139-153
- MOSSMAN, T.R. & FONG, T.A.T. (1983) Specific assays for cytokine production by cells. *J. Immunol. Methods*, 116: 151-158
- MOST, A. (1985) *Peganum harmala: The hallucinogenic herb of the American Southwest*. Venom Press, Copyright
- NARANJO, P. (1967) Psychotropic properties of harmala alkaloids. In: *Ethnopharmacological search for psychoactive drugs*. Ed. D.H. Efrons, B. Holmstedt and N.S. Kline U.S. Public Health Service Publication No 1645; Washington, DC: 385-391
- NARANJO, P. (1979) Hallucinogenic plant use and related indigenous belief systems in the Ecuadorian Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, 1(2): 121-145
- NIE, N.H.; HULL, C.H.; JENKINS, J.G.; STEINIBRENNER, K.; BENT, D.H. (1975) *Statistical package for the social sciences*. 2 ed. McGraw-Hill, New York
- NIITSU, N. & UMEDA, M. (1997) THP-COPBLM (pirarubicin, cyclophosphamide, vincristine, prednisone, bleomycin and procarbazine) regimen combined with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) for non-Hodgkin's lymphoma in elderly patients: a prospective study. *Leukemia*, 11(11): 1817-1820
- NIKS, M.; OTTO, M.; BUSOVA, B.; STEFANOVIC, J. (1990) Quantification of proliferative and suppressive responses of human T lymphocytes following ConA stimulation. *J. Immunol. Methods*, 126: 263-271
- ODA, Y.; NAKAMURA, S.; OKI, I. (1988) Harman and norharman induce SOS responses and frameshift mutations in bacteria. *Mutation Research*, 208: 39-44
- OLDEN, K.; BRETON, P.; GRZEGORZEWSKI, K.; YASUDA, Y.; GAUSE, B.L.; OREDIPE, O.A.; NEWTON, S.A.; WHITE, S.L. (1991) The potential importance of swainsonine in therapy for cancers and immunology. *Pharmacol Ther*, 50: 285-290
- PICADA, J.N.; DA SILVA, K.V.C.L.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, A.T.; HENRIQUES, J.A.P. (1997) Genotoxic effects of structurally related β -carboline alkaloids. *Mutation Research*, 379: 135-149
- POINDEXTER, E.H.Jr & CARPENTER, R.D. (1962) The isolation of harmane and norharmane from tobacco and cigarette smoke. *Phytochemistry*, 1: 215-221
- ROMMELSPACHER, H.; NANZ, C.; BORBE, H.O.; FEHSKE, K.; MÜLLER, W.E.; WOLLERT, U. (1980) 1-methyl- β -carboline (harmane), a potent endogenous inhibitor of benzodiazepine receptor binding. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 314: 97-100

- ROMMELSPACHER, H.; MAY, H.; SUSILO, R. (1991) Beta-carbolines and tetrahydroisoquinolines: detection and function in mammals. *Planta Medica*, 57(7): S85-S92
- ROMMELSPACHER, H.; MAY, T.; SALEWSKI, B. (1994) Harman (1-methyl-beta-carboline) is a natural inhibitor of monamine oxidase type A in rats. *European Journal of Pharmacology*, 252(1): 51-59
- ROY, S.; CHAPIN, R.B.; CAIN, K.J.; CHARBONEAU, R.G.; RAMAKRISHNAN, S.; BARKE, R.A (1997) Morphine inhibits transcriptional activation of IL-2 in mouse thymocytes. *Cellular Immunology*, 179(1):1-9
- RUSSEL, N.H. (1992) Autocrine growth factors and leukaemic haemopoiesis. *Blood Review*, 6(3): 149-156
- RUTTEN, A.A. & WILMER, J.W. (1986) Effect of cigarette-smoke condensate and norharman on the induction of SCEs by direct and indirect mutagens in CHO cells. *Mutation Research*, 172: 61-67
- SACERDOTE, P.; MANFREDI, B.; MANTEGAZZA, P.; PANERAI, A.E. (1997) Antinociceptive and immunosuppressive effects of opiate drugs: a structure-related activity study. *Br. J. Pharmacol*, 121(4):834-840
- SASAKI, Y.F.; YAMADA, H.; SHIMOI, K.; KINAE, N.; TOMITA, I.; MATSUMURA, H.; OHTA, T.; SHIRASU, Y. (1992) Enhancing effects of heterocyclic amines and β -carbolines on the induction of chromosome aberrations in cultured mammalian cells. *Mutation Research*, 269:79-95
- SASAKI, Y.F. & SHIRASU, Y. (1993) Suppressing effects of S phase post-treatment with carbolines on sister-chromatid exchanges induced by mitomycin C in chinese hamsters cells. *Mutation Research*, 302: 165-171
- SCHLOTTFELDT, J.; BLASINA, L.R.; WANNAMACHER, C.M.D.; WAJNER, M. (1995) The effect of organic acids on phytohaemagglutinin-activated proliferation of human lymphocytes *in vitro*. *International Journal of Immunopharmacology*, 17(3): 175-182
- SHUTLES, R.E. (1994) Amazonian ethnobotany and the search of new drugs. *Ciba Found Symp*, 185:106-112
- SLADOWSKI, D.; STREER, S.J.; CLOTHIER, R.; BALL, M. (1993) Na improved MTT assay. *J.F. Immunol. Methods*, 157: 203-207
- SLOTKIN, T.A. & DISTEFANO, V. (1970) Cardiovascular and respiratory effects of Harmine. *Proc Soc Experimental. Biology Medicine*, 133: 662-664
- SOFUNI, T. & YOSHIDA, M.C. (1992) Combined use of several mitogens for mitotic stimulation to human lymphocytes. *J. Radiat. Res*, 33:222-230

- SOMMER, M.H.; XAVIER, M.H.; FIALHO, M.B.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M. (1994) The influence of amino acids on mitogen-activated proliferation of human lymphocytes *in vitro*. *International Journal of Immunopharmacology*, 16(10): 865-872
- STAFFORD, P. (1992) *Psychedelics Encyclopedia*. 3 ed. Ronin Publishing (PGW)
- SUGIMURA, T.; NAGAO, M.; WAKABAYASHI, K.; (1994) Heterocyclic amines in cooked foods: candidates for causation of common cancers. *Journal Natl. Cancer Inst.* 86: 2-4
- SUSILO, R. & ROMMELSPAHCER, H. (1988) Formation of 1-methyl-b-carbolines in rats from their possible carboxylic acid precursor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 337: 566-571
- SUTTON, L.C.; LEA, S.E.; WILL, M.J.; SCHWARTZ, B.A.; HARTLEY, C.E.; POOLE, J.C.; WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. (1997) Inescapable shock-induced potentiation of morphine analgesia. *Behav Neurosci*, 111(5): 1105-1113
- TAKEHISA, S. & KANAYA, N. (1982) SCE induction in human lymphocytes by combined treatment with aniline and noraharman. *Mutation Research*, 101: 165-172
- TREASE, G.E. & EVANS, W.C. (1978) *Pharmacognosy*. 7 ed. Baillière Tindall, London
- TSE, S.Y.H.; MAK, I.T.; DICKENS, B.F. (1991) Antioxidative properties of harmane and β -carbolines alkaloids. *Biochemical Pharmacology*, 42(3): 459-464
- WAKABAYAH, K., TOTSUKA, Y.; FUKUTOME, K.; OGURI, A.; USHIYAMA, H.; SUGIMURA, T. (1997) Human exposure to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines and comutagenic β -carbolines. *Mutation Research*, 376:253-259
- WEHNER, F. C.; THIEL, P. G.; RENSBURG, S. J. V.; (1979) Mutagenicity of alkaloids in the Salmonella/microsome system. *Mutation Research*, 66:187-190
- WITSCHI, H.; ESPIRITU, L.; MARONPOT, R.R. PNKERTON, K.E. JONES, A.D. (1997) The carcinogenic potential of the gas phase of enviromental tobacco smoke. *Carcinogenesis*, 18(11): 2035-2042
- WRIGHT, E.E.; BIRD, J.L.; FELDMAN, J.M. (1979) The effect of harmine and other moanoamine oxidase inhibitors on N-acetyltransferase activity. *Research Communication in Chemical Pathology and Pharmacology*, 24: 259-272
- XU, W.; BAI, F.; TUMMALAPALLI, C.M.; MILLER, D.D.; MIDDAUGH, L.; BOGGAN, W.O. (1997) The interactive effects of cocaine/gender on immune function in mice. An observation of *in vivo* acute cocaine exposure. *International Journal of Immunopharmacology*, 19(6): 333-340

- YAMASHITA, K.; OHGAKI, H.; WAKABAYASHI, K.; NAGAO, M.; SUGIMURA, T. (1988) DNA adducts formed by the comutagens harman and norharman in various tissues of mice. *Cancer Letters*, 42: 179-183
- YOUNG, R. & GLENNON, R.A. (1997) Cocaine-stimulus generalization to MDA optical isomers: a reevaluation. *Pharmacol Biochem Behav*, 57(1-2): 115-118
- ZHANG, L.; HUANG, Y.; QIAM, Y.; XIAO, P (1995) Effect of deoxynupharidine on immune function in vitro. *Chung Kuo I Hsueh Ko Hsueh Yuan Hsueh Pao*;17(5):343-8
- ZHANG, S. & PETRO, T.M. (1996) The effect of nicotine on murine CD4 T cell responses. *International Journal of Immunopharmacology*, 18(8-9): 467-478