



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular



ESTUDO DOS ALCALÓIDES β -CARBOLÍNICOS
EM DIFERENTES MODELOS BIOLÓGICOS

Dinara Jaqueline Moura

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Jenifer Saffi

Porto Alegre

2006

Este trabalho foi desenvolvido nas instalações do Laboratório de Radiobiologia Molecular do Departamento de Biofísica desta Universidade e na Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai (URI). Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Laboratório de Genotoxicidade (GENOTOX) e UFRGS.

Aos meus pais, Dirceu e Dinorá,
pelo apoio sempre necessário, por serem
as pessoas mais maravilhosas do mundo.
Obrigada pelo exemplo de vida, de fé
perseverança, e fundamentalmente de
amor.

AGRADECIMENTOS

A Professora Dr^a. Jenifer Saffi por sua valiosa orientação e apoio durante as várias etapas deste trabalho, pelas inúmeras oportunidades de crescimento as quais me proporcionou, pela amizade, confiança, e conhecimento compartilhado.

Ao Professor Dr. João Antônio Pêgas Henriques, por todas as oportunidades, pelo conhecimento compartilhado e amizade.

A Professora Dr^a. Jane Boeira, pela oportunidade inicial, serei sempre grata.

Ao Professores, membros da minha Comissão de Acompanhamento, Dr. Rafael Roesler pela colaboração e orientação e, Dr. José Cláudio Fonseca Moreira pelos sempre pertinentes conselhos e sugestões sobre o trabalho.

A Professora Dr^a. Fabiana Horn, pela oportunidade em sua disciplina e por todas as “ajudas”.

A todos os funcionários e professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular pela convivência e apoio. Especialmente à Silvia Centeno e Luciano Saucedo pela amizade, pela sempre disponibilidade e inúmeras ajudas.

A Márcia Vaz por toda ajuda dispensada e pela amizade.

A todos os funcionários do Departamento de Biofísica, por tornarem tão agradável e divertido o tempo em que ficamos trabalhando.

A todos os colegas e amigos do Laboratório 210 do Departamento de Biofísica: Giovanni, Renato, Diego, Albanin, Knulp, Ana Ziles, Ana Catarina, Mateus, Betina, Nusha, Fernanda, Nicolas, Rafael, Cláudio e Duda pelas inúmeras risadas e por tornarem o ambiente de trabalho tão agradável, e óbvio por todos os happy hours e overnights já compartilhados.

Às colegas do Laboratório de Genotoxicidade: Izabel, Miriana e Mirian, pela amizade e ótimos momentos de convívio dentro e fora do laboratório e pelas muitas festinhas.

Aos colegas do laboratório 219 do Centro de Biotecnologia: Cassiana e Jaque pela convivência, apoio e ajuda. Ao Bacana pelos inúmeros mates e Twix.

As “minhas” bolsistas Bibiana e Ana Catarina, pela ajuda na realização deste trabalho e pela amizade. Aprendi e aprendo muito com vocês.

Ao colega e grande amigo Renato Rosa, pela incansável e solícita ajuda sempre necessária, por todos os conselhos, enfim por todos os momentos alegres e divertidos compartilhados dentro e fora do laboratório, especialmente fora e como ele diria “*é muita socialização*”.

Ao colega Diego Bonatto pelas discussões sobre o trabalho e inúmeras sugestões.

Ao colega e amigo Rafael Roehrs pelos primeiros passos dentro do laboratório, pelas inúmeras ajudas e as várias festinhas.

As minhas grandes amigas de Sangu City (Ala Diretoria): Tatiana, Preta, Katyanna, Isabel, Vivian, Daniela, Joviane e Lilian, pelo apoio e por compartilharem tantas coisas em todos estes anos.

A toda minha família, especialmente aos meus irmãos: Daiana, Paulo, Guto, Mario, Sandra e Andréia pelo incentivo e apoio, amo todos vocês.

Às minhas irmãs, Sandra por ser um exemplo de coragem e garra em enfrentar desafios e, Andréia por compartilhar seus conhecimentos e experiências em tantas coisas, pelos conselhos e força.

Aos melhores pais do mundo, os meus, Dirceu e Dinorá, pela constante demonstração de amor, pela confiança, oportunidade e todo apoio que sempre precisei, amo muito vocês.

Ao Knulp pela paciência, e também pelo valioso auxílio nesta etapa final.

A todos que de uma maneira ou outra me auxiliaram e apoiaram na realização deste trabalho.

Obrigada.

ÍNDICE GERAL

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
I – INTRODUÇÃO	1
1. ALCALÓIDES	1
1.1 Aspectos gerais.....	1
1.2 Alcalóides β -carbolínicos.....	2
1.2.1 Propriedades químicas e físico-químicas dos alcalóides β -carbolínicos.....	7
1.2.2 As β -carbolinas e o sistema nervoso.....	8
1.2.3 β -carbolinas e ação antioxidante.....	9
1.2.4 Outras propriedades farmacológicas e efeitos genotóxicos.....	10
2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	11
2.1 Fontes de ERO nos sistemas biológicos.....	12
2.2 Radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$).....	13
2.3 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2).....	13
2.4 Radical hidroxila (OH^{\bullet}).....	13
2.5 Oxigênio singlete (1O_2).....	15
2.6 Radicais alcoxil (RO^{\bullet}) e peroxil (ROO^{\bullet}).....	15
2.7 Radical hidroperoxila (HO_2^{\bullet}).....	15
2.8 Danos oxidativos a biomoléculas.....	15
3. SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE	16
3.1 Superóxido dismutase (Sod).....	17
3.2 Catalase (Cat).....	18
3.3 Glutationa, glutatona peroxidase (GSH-Px) e glutatona reduzida (GSH).....	18

4. A LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> COMO MODELO DE ESTUDO	19
4.1 Defesas antioxidantes e testes de sensibilidade em <i>S. cerevisiae</i>	20
4.2 Testes de mutação <i>forward</i>	21
5. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTI-GENOTÓXICA	22
6. ESTUDO DE MEMÓRIA DE CURTA E LONGA DURAÇÃO	24
II - OBJETIVOS	26
1. Objetivo geral.....	26
2. Objetivos específicos.....	26
III – CAPÍTULO I	27
“Antioxidant action of β -carboline alkaloids in yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and mammalian cells (V79) exposed to oxidative stress conditions”.....	27
IV – CAPÍTULO II	55
“Effects of β -carboline derivatives on object recognition in mice”.....	55
V – DISCUSSÃO GERAL	76
1. Atividade antioxidante e antimutagênica em levedura e antígenotóxica em cultura de células de mamíferos.....	77
2. Efeito dos alcalóides β -carbólicos sobre a memória.....	81
VI – CONCLUSÕES	83
VII – PERSPECTIVAS	85
VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXOS	109

LISTA DE FIGURAS

I. INTRODUÇÃO

Figura 1. Estruturas do núcleo indólico (A) e anel piridínico (B) presentes nos alcalóides β -carbolínicos.....	3
Figura 2. Estrutura química de alguns alcalóides β -carbolínicos.....	4
Figura 3. Principais etapas da biossíntese dos alcalóides β -carbolínicos.....	5
Figura 4. Reação de Pictet-Spengler.....	6
Figura 5. Equilíbrios de dissociação de harmano, estado S_0	7
Figura 6. Equilíbrio de dissociação do harmalol.....	8
Figura 7. Redução univalente da molécula de oxigênio.....	12
Figura 8. Representação da formação do radical OH pelas reações Haber-Weiss/Fenton (Adaptado de HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).....	14
Figura 9. Vias endógenas de destruição das espécies reativas de oxigênio (ERO), onde é mostrada a localização subcelular das principais vias de destruição enzimática de ERO é mostrada.....	17
Figura 10. Estrutura química dos análogos arginina e canavanina.....	22

II. CAPÍTULO I

Figure 1. Chemical structure of the β -carboline alkaloids. (A) aromatic β -carboline. (B) dihydro- β -carbolines.....	49
Figure 2. Effect of pre-treatments with β -carbolines on survival to oxidant H_2O_2 in EG103 (WT) and mutants isogenic strains and YPH98 (WT) and mutant isogenic strains. (A) harmane, (B) harmine, (C) harmol, (D) harmalol, (E) harmaline.....	50
Figure 3. Effect of pre-treatments with β -carbolines on survival to oxidant paraquat in EG103 (WT) and mutants isogenic strains and YPH98 (WT) and mutant isogenic strains. (A) harmane, (B) harmine, (C) harmol, (D) harmalol, (E) harmaline.....	52

Figure 4. Inhibition of reactive oxygen species generation by β -carboline alkaloids in hypoxanthine/xanthine oxidase systems.....	54
---	----

III – CAPÍTULO II

Figure 1. Effect of 30 min pre-training i.p. injection of harmine (1.0, 2.5 or 5.0 mg/kg) on memory novel object recognition task in mice.....	73
---	----

Figure 2. Effect of 30 min pre-training i.p. injection of harmol (1.0, 2.5 or 5.0 mg/kg) on memory novel object recognition task in mice.....	74
--	----

Figure 3. Effect of 30 min pre-training i.p. injection of harmaline (1.0, 2.5 or 5.0 mg/kg) on memory novel object recognition task in mice.....	75
---	----

ANEXOS

Figura 1. Sensibilidade das diferentes linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> aos em fase estacionária de crescimento alcalóides β -carbólicos harmano (A), harmina (B), harmol (C), harmalol (D) e harmalina (E).....	109
---	-----

LISTA DE TABELAS

II – CAPÍTULO I

Table 1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains used in this study.....	46
Table 2. Effects of β -carbolinics alkaloids on induced mutagenicity by hydrogen peroxide (H_2O_2) in haploid N123 strain of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in the stationary phase in PBS.....	47
Table 3. Effect of β -carboline alkaloids in V79 cells exposed for 2 hours plus oxidant H_2O_2 for 0.5 h and evaluated by Comet Assay.....	48

III – CAPÍTULO II

Table 1. Total amount of time spent exploring both objects during object recognition training in mice given an i.p. injection of saline or alkaloids (1.0, 2.5 or 5.0 mg/kg) 30 min before training.....	72
---	----

ANEXOS

Tabela 1. Indução de mutação na linhagem haplóide N123 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após tratamento com harmano, harmina, harmol, harmalina e harmalol em fase estacionária de crescimento em PBS.....	112
Tabela 2. Efeito dos alcalóides harmano, harmina, harmol, harmalol e harmalina em células V79 tratadas por duas horas e avaliadas pelo Teste Cometa.....	113

ABREVIATURAS

^{14}C	carbono 14
^3H	trítio
5-HT	5-hidroxitriptamina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
ATP	adenosina trifosfato
CAT	catalase
D ₁ /D ₂	receptores de dopamina
DHBA	ácido dihidroxibenzóico
DNA	ácido desoxirribonucléico
ERO	espécies reativas de oxigênio
GSH-Px	glutaciona peroxidase
GSH	glutaciona reduzida
GSSG	glutaciona oxidada
IMAO	inibidores enzima monoamino-oxidase
LTM	memória de longa duração (<i>long term memory</i>)
MAO-A	enzimamonoamino-oxidase tipo A
MK-801	[3- H^3H]5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5- 10imina
MPTP	N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
NMDA	N-metil-D-aspartato
$\text{O}_2\cdot^-$	radical superóxido
$\text{OH}\cdot$	radical hidroxila
PBS	tampão salina-fosfato
PC12	células feocromocitoma 12 (<i>pheochromocytoma cells 12</i>)
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
STM	memória de curta duração (<i>short term memory</i>)
WT	linhagem selvagem

Yap1 fator de transcrição yap1
YPD meio completo para leveduras

RESUMO

Os alcalóides β -carbolínicos possuem uma ampla distribuição, sendo encontrados em várias famílias de plantas, além de estarem presentes na fumaça do cigarro, bebidas alcoólicas, alimentos excessivamente cozidos e em mamíferos. Estes alcalóides são conhecidos por apresentarem várias ações farmacológicas sobre os sistemas nervoso central, muscular e cardiovascular, causando alucinações, tremores, convulsões, hipotensão e bradicardia. Possuem também atividade antioxidante e imunossupressora, além de ligarem-se a receptores de serotonina, dopamina, benzodiazepina; são também inibidores das enzimas monoamino-oxidase-A (MAO-A) e DNA topoisomerases.

Os objetivos do presente estudo foram avaliar os possíveis efeitos antioxidantes, antimutagênicos, antigenotóxicos e neurocomportamentais dos alcalóides β -carbolínicos: harmano, harmina, harmol, harmalol e harmalina, utilizando teste de sensibilidade e antimutagênese em *Saccharomyces cerevisiae*, ensaio cometa em cultura de células de pulmão de hamster chinês (V79) e avaliação do comportamento, através da tarefa de reconhecimento de novo objeto, em camundongos, respectivamente.

Em testes de sensibilidade, todos os alcalóides protegeram as linhagens deficientes em sistemas de defesa antioxidante de *S. cerevisiae* contra danos induzidos pelos oxidantes H_2O_2 e paraquat. De maneira geral, os alcalóides β -carbolínicos protegeram mais as células dos danos gerados pelo H_2O_2 e o aumento da viabilidade foi mais significativo para as linhagens *sod1 Δ* , *sod2 Δ* e *sod1 Δ sod2 Δ* . Também, possivelmente por uma ação sequestradora de espécies reativas de oxigênio, os alcalóides β -carbolínicos mostraram forte atividade contra danos no DNA induzidos pelo H_2O_2 , no teste de antimutagênese com a linhagem N123 de *S. cerevisiae* e no teste de antigenotoxicidade, utilizando o ensaio cometa com células V79. As dihidro- β -carbolinas harmalina e harmalol mostraram um efeito mais pronunciado que as β -carbolinas nos ensaios citados acima.

Quanto à avaliação dos efeitos neurocomportamentais em camundongos, a administração sistêmica dos alcalóides β -carbolínicos facilitou a formação de memória de curta duração, no caso da harmina, harmol e harmalina e, também a memória de longa duração (harmalina) em camundongos, verificada com uso da tarefa de reconhecimento de novo objeto.

ABSTRACT

The β -carboline alkaloids possess a wide distribution, being found in several families of plants. They are also found in cigarette smoke, overcooked foods, wine and also in mammals. These alkaloids are known for their action on the central nervous system, muscular and cardiovascular systems, causing hallucination, tremor, convulsion, hypotension and bradycardia. They also possess antioxidant and immune suppressor activities, besides binding to serotonin, dopamine and benzodiazepine receptors; moreover they are inhibitors of monoamino-oxydases and DNA topoisomerase enzymes.

The aim of the present study was to evaluate the possible antioxidant, antimutagenic, antigenotoxic and neurobehavioral effects of the β -carboline alkaloids: harmine, harmol, harmalol and harmaline, by means of sensitivity and antimutagenic assays in *Saccharomyces cerevisiae*, antigenotoxicity by comet assay in Chinese hamster lung fibroblasts (V79), as well as in behavioral procedures, through novel object recognition task in mice.

In the sensitivity assay, all alkaloids protected *S. cerevisiae* strains deficient in antioxidant defense against oxidative damage induced by H₂O₂ and paraquat. In a general way, the β -carboline alkaloids protected more the cells of the damages generated by the H₂O₂ and the increase of the viability was more significant in *sod1* Δ , *sod2* Δ and *sod1* Δ *sod2* Δ strains. Possibly due to a scavenger action, they have shown strong activity against H₂O₂ -induced oxidative damage on DNA, in anti-mutagenic assay using N123 strain of *S. cerevisiae* and anti-genotoxic assay using mammalian V79 cell. The dihydro- β -carbolines showed again a more pronounced effect than aromatic β -carbolines.

Moreover, the present study evaluated the effects of the systemic administration of these compounds on novel recognition memory in mice. The systemic administration of harmine, harmol and harmaline induces a facilitation of formation of short-term memory recognition memory, while harmaline also induces a facilitation of long-term memory in the novel recognition task.

I - INTRODUÇÃO

1. ALCALÓIDES

1.1 Aspectos Gerais

Os alcalóides são constituídos por um grande grupo de metabólitos, de uma variedade estrutural bastante ampla. Este grupo de produtos naturais sempre influenciou a história econômica, médica, política e social da humanidade (ROBBERS *et al.*, 1997). Desde os primórdios da civilização, pode-se observar o uso de extratos vegetais contendo alcalóides em medicamentos, venenos e poções mágicas (SIMÕES *et al.*, 1999).

Como exemplos do uso de alcalóides, pode-se citar, na Grécia antiga, a morte de Sócrates pela ingestão de uma bebida preparada à base de cicuta contendo o alcalóide coniina. No império romano, Lívia, esposa do imperador Augusto, eliminava inimigos e rivais políticos assassinando-os em banquetes com o uso de beladona, fonte do alcalóide atropina, adicionada aos alimentos (SIMÕES *et al.*, 1999; ROBBERS *et al.*, 1997). Os alcalóides do fungo do esporão de centeio foram responsáveis por epidemias de envenenamento em massa, entre a população da Europa durante a idade média, devido à ingestão do pão de centeio (ROBBERS *et al.*, 1997). Os índios da bacia Amazônica utilizam o extrato seco de curare, contendo o alcalóide tubocurarina, para preparar dardos e flechas envenenadas empregadas na caça e nas guerras (SIMÕES *et al.*, 1999).

Devido a estes fatos citados acima, os alcalóides tornaram-se um grupo de substâncias de grande importância para os pesquisadores pelos seus efeitos tóxicos e também medicinais. Muitos alcalóides são protótipos para elaboração de fármacos. Atualmente diversos deles são utilizados na terapêutica, puros ou em associação, e também na forma de derivados. Entre outras atividades farmacológicas inclui-se atividade anti-diurética (ajmalicina), hipotensiva (reserpina, iombina), alucinogênica (mescalina), antimalárica (quinina), antitussígena (codeína e noscapina), miorelaxante (tubocurarina), e outras (PELETIER, 1983; HENRIQUES *et al.*, 1999).

Alcalóides são encontrados em representantes de todos os grupos vegetais. Nas angiospermas, ocorrem nas dicotiledôneas e também em algumas monocotiledôneas; são

pouco freqüentes nas Gimnospermas e Pteridófitas (COSTA, 1993). A grande maioria possui caráter alcalino (BRUNETON, 1992; SIMÕES *et al.*, 1999).

Os alcalóides localizam-se nos vegetais principalmente em quatro tipos de tecidos ou células: tecidos com crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos. Intracelularmente, são sintetizados no retículo endoplasmático concentrando-se, em seguida, nos vacúolos e, dessa maneira, não aparecem em células jovens antes de ocorrer à formação dessas estruturas. O local de estoque dos alcalóides é diferente daquele no qual foram sintetizados (SIMÕES *et al.*, 1999).

Alcalóides são produtos de detoxificação de substâncias nocivas geradas pelo metabolismo primário vegetal e fonte de reserva de nitrogênio. Acredita-se que estes compostos possuam a função de hormônios reguladores do crescimento e que, provavelmente, sejam os responsáveis pela defesa da planta contra microorganismos e vírus (SIMÕES *et al.*, 1999).

De maneira geral, os alcalóides são formados a partir de aminoácidos. Os mais comumente utilizados na biossíntese dos alcalóides são: ácido α -aspártico (piridinas e isoquinoleínas), α -lisina (piperidinas e quinolizidinas), α -tirosina (isoquinolinas, benzilisoquinolinas, betalaínas), α -triptofano (derivados da triptamina, β -carbolinas, indóis complexos), α -histidina (imidazóis) (SIMÕES *et al.*, 1999). Entre os outros precursores usados na biossíntese dos alcalóides, pode-se citar o ácido mevalônico, ácido antranílico, terpenos e esteróides (SIMÕES *et al.*, 1999).

Várias substâncias com estrutura clássica de alcalóides têm sido isoladas de outros organismos. Foram encontrados em alguns gêneros de fungos (*Claviceps purpúrea*, *Amanita muscarina*, etc), em bactérias (piocianina, em *Pseudomonas aeruginosa*) e em mamíferos (AIRAKSINEN & KARI, 1981; BRUNETON, 1992; HASHIMOTO & YAMADA, 1994).

1.2 Alcalóides β -carbolínicos

As β -carbolinas pertencem aos alcalóides do grupo indólico que, além de apresentarem um núcleo indólico, possuem um anel piridínico hidrogenado de seis membros (figura 1) (ALLEN & HOLMESTEDT, 1980; HENRIQUES *et al.*, 1999). Estes alcalóides são conhecidos como alcalóides do harmala, pois os primeiros a serem

descobertos foram a harmalina e a harmina, a partir das sementes de *Peganum harmala*, planta utilizada em rituais religiosos com ação alucinogênica (ALLEN & HOLMSTEDT, 1980; HASHIMOTO *et al.*, 1988).

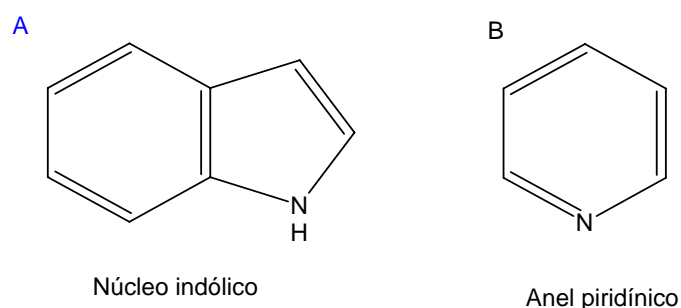
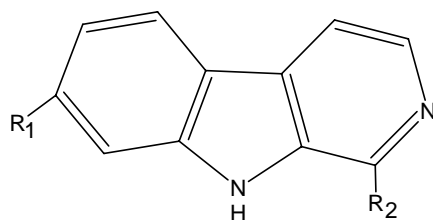


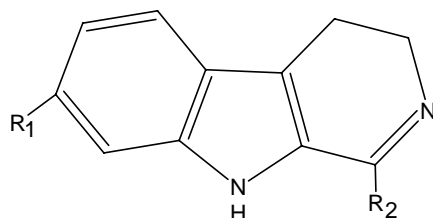
Figura 1. Estruturas do núcleo indólico (A) e anel piridínico (B) presentes nos alcalóides β -carbolínicos. (Adaptado de BOEIRA, 2001).

As β -carbolinas podem ser divididas em três grupos estruturais dependendo do grau de saturação do anel: (a) as totalmente aromáticas; (b) as dihydro- β -carbolinas ou derivados do harmalano; (c) as tetrahydro- β -carbolinas, com anel piridínico totalmente saturado (figura 2) (GLENNON *et al.*, 2000).

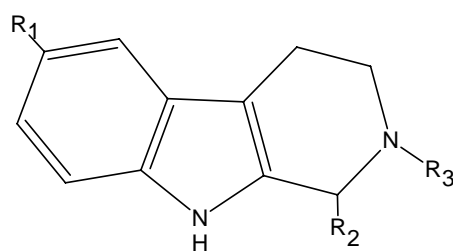
Estes alcalóides possuem uma distribuição bastante diversificada. São encontrados principalmente em plantas das famílias Zygophyllaceae, Malpighiaceae, Passifloraceae, Leguminosae, Myristicaceae e Ebenaceae. Ocorrem também, embora em menor número, na fumaça do cigarro, nos alimentos excessivamente cozidos ricos em proteínas, em alguns animais, inclusive mamíferos, fungos, vinhos e no saquê (ALLEN & HOLMSTEDT, 1980; AIRAKSINEN & KARI, 1981; HASHIMOTO *et al.*, 1988; BRUNETON, 1992; TOTSUKA *et al.*, 1999). A casca e a folha de *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae), uma planta da América do Sul que contém harmalina e harmina, são utilizadas na preparação de uma bebida conhecida como ayahuasca (yagé, hoasca, daime ou caapi). Esta bebida é obtida a partir da fervura destas partes da planta junto com as folhas de *Psychotria viridis*, que contém triptaminas, resultando em um potente alucinógeno utilizado em rituais religiosos no Brasil, Bolívia, Equador e Peru (CALLAWAY *et al.*, 1996; 1999; FREEDLAND & MANSBACH, 1999).

(A) Sistema β -carbolina

	R ₁	R ₂
Norharmano	H	H
harmano	H	CH ₃
harmol	OH	CH ₃
harmina	OCH ₃	CH ₃

(B) Sistema dihidro- β -carbolina

	R ₁	R ₂
harmalol	OH	CH ₃
harmalina	OCH ₃	CH ₃

(C) Sistema tetrahidro- β -carbolina

	R ₁	R ₂	R ₃
1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina (THBC)	H	H	H
2-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina (2MT-THBC)	H	H	CH ₃
6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina (2MeO-THBC)	OCH ₃	H	H
1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina (1MT-THBC)	H	CH ₃	H

Figura 2. Estrutura química de alguns alcalóides β -carbolínicos. (Adaptado de PICADA, 1997).

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

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

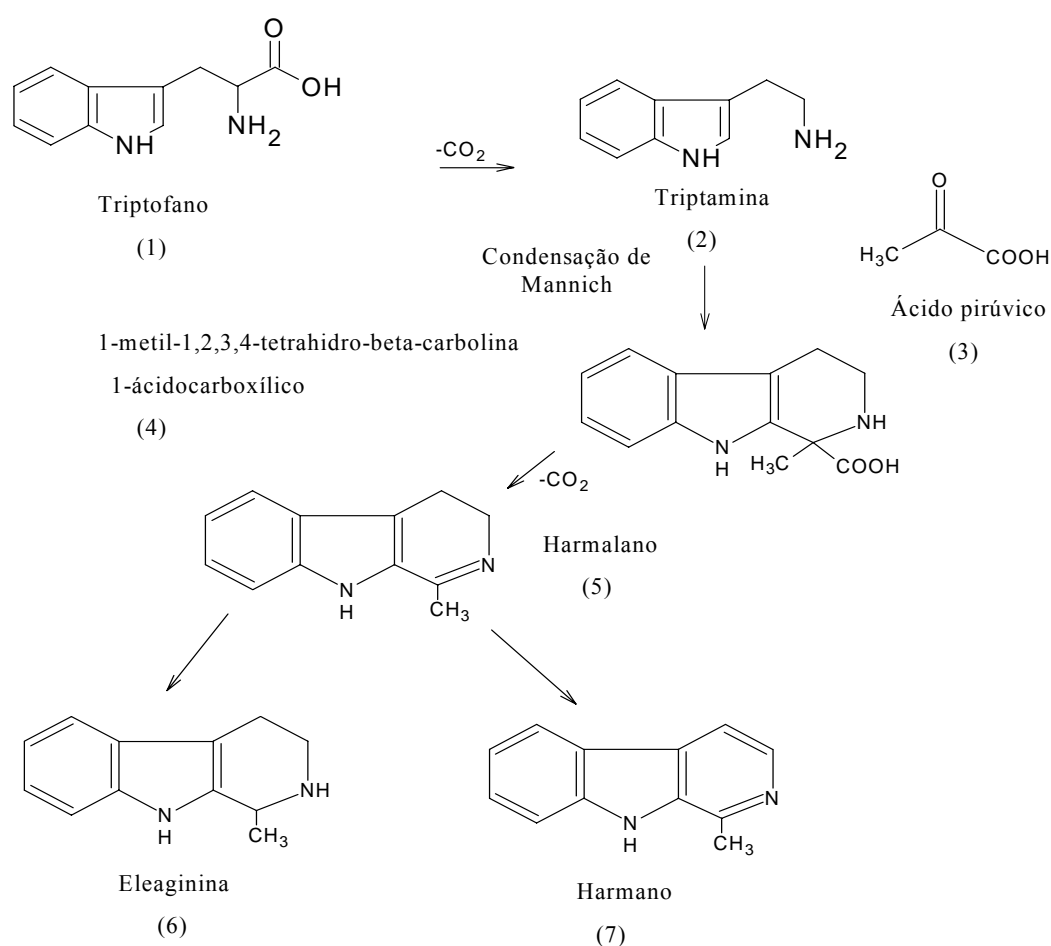


Figura 3. Principais etapas da biossíntese dos alcalóides β -carbolínicos. (Adaptado de PICADA, 1997).

Nos mamíferos, pesquisadores acreditam que as β -carbolinas sejam formadas endogenamente pela reação de Pictet-Spengler (figura 4), na qual um componente carbonil (formaldeído ou acetaldeído) é condensado com uma indolamina (triptamina, 5-hidroxitriptamina, 5-metoxitriptamina, N-metiltriptamina, etc.), reação análoga à observada nos vegetais (para revisão ver, DUCROT *et al.*, 2000). A partir desta condensação forma-se o 1-metila-1-carbóxi-tetraidro- β -carbolina que é metabolizado através do anel hidroxilado (na posição -5, -6 e -7), descarboxilado, metilado e desidrogenado formando os compostos da família das β -carbolinas (DUCROT *et al.*, 2000). A reação foi repetidamente demonstrada em homogenatos de cérebro de roedores e também em outros tecidos e espécies, incluindo plaquetas humanas e homogenatos de cérebro humano (STEBBINS *et al.*, 1976; BARKER *et al.*, 1979; PEARSON & TURNER, 1979; HONECKER *et al.*, 1980; BARKER *et al.*, 1981; COLLINS, 1983; ROMMELSPACHER *et al.*, 1994).

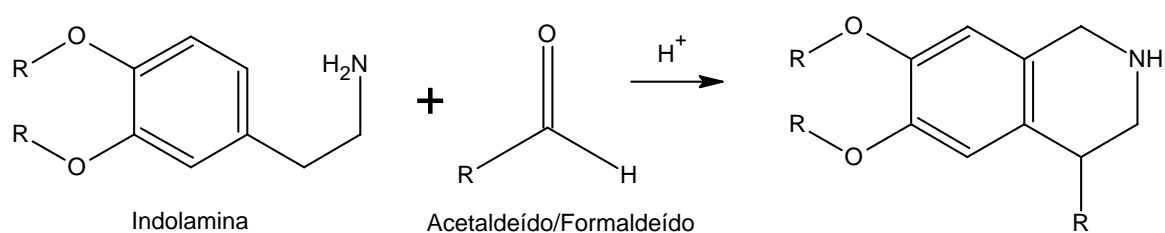


Figure 4. Reação de Pictet-Spengler. (Adaptado de BOEIRA, 2001).

Embora alguns desses compostos em mamíferos possam ser de origem exógena, há uma notável diferença estrutural entre as β -carbolinas vegetais e aquelas encontradas em animais. Nas plantas, as estruturas insaturadas β -carbolina e dihydro- β -carbolina são mais freqüentes. A posição 1, em geral, está metilada e a posição 7 substituída por hidroxila ou metoxila. Já os tecidos de mamíferos parecem formar primariamente tetrahydro- β -carbolinas, com ou sem grupo metoxi ou hidroxila na posição 6 (AIRAKSINEN & KARI, 1981).

1.2.1 Propriedades químicas e físico-químicas dos alcalóides β -carbolínicos

Os alcalóides β -carbolínicos, testados neste estudo, harmano, harmina, harmol, harmalol e harmalina são constituídos pelo sistema tricíclico pirido (3,4-b) indol e estão divididos em dois grupos. O primeiro grupo é formado por harmano, harmina e harmol, que possuem anel piridínico aromático (sistema β -carbolina, figura 2A). O segundo grupo é formado por harmalol e harmalina que apresentam anel piridínico parcialmente insaturado (sistema dihidro- β -carbolina, figura 2B). Todos contêm uma metila na posição C1 e diferem, dentro de cada grupo, por substituintes, metoxila ou hidroxila, na posição C7 (substituinte R_1 da figura 2A e 2B).

Estes compostos possuem pontos de fusão moderadamente altos: harmano ($C_{12}H_{10}N_2$): 237-238°C, harmina ($C_{13}H_{12}ON_2$): 257-259°C, harmol ($C_{12}H_{10}ON_2$): 304-307°C, harmalol ($C_{12}H_{12}ON_2$): 212°C e harmalina ($C_{13}H_{14}ON_2$): 229-231°C. Todos exibem forte fluorescência em luz visível e em UV, especialmente os dihidro- β -carbolínicos harmalina e harmalol (THE MERCK INDEX, 1989).

O comportamento ácido-básico desses cinco alcalóides foi investigado sendo que a estrutura β -carbolina apresenta dois pontos-chaves para o estudo dos equilíbrios de dissociação em soluções aquosas: o grupo NH fracamente ácido do anel indólico e o átomo de nitrogênio básico do anel piridínico. Harmol e harmalol possuem ainda uma hidroxila no C7 suscetível a ionização (WOLFBEIS *et al.*, 1982; HARDIMAN *et al.*, 1987).

Harmano, harmina e harmalina, em soluções aquosas, dependendo do pH existem, em pelo menos três espécies diferentemente carregadas, catiônicas, neutras e aniônicas, identificadas no estado fundamental S_0 por espectros de absorção. Já os espectros de fluorescência acusam uma quarta espécie, a anfotérica, resultante da fotoexcitação para o estado S_1 (REYMON *et al.*, 1999). A figura 5 representa os equilíbrios de dissociação do harmano.

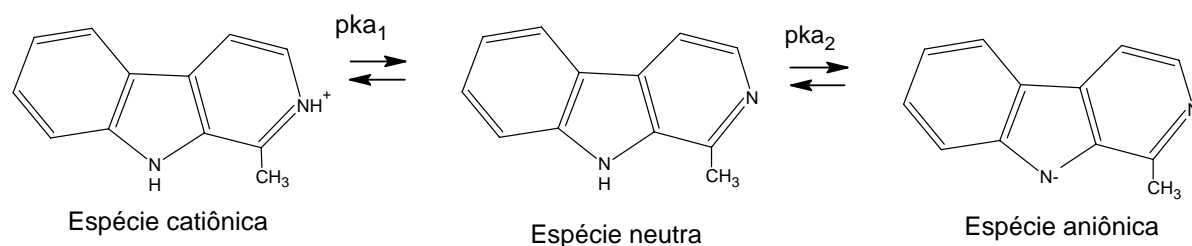


Figura 5. Equilíbrios de dissociação de harmano, estado S_0 . (Adaptado de PICADA, 1997).

Harmol e harmalol, devido ao grupo hidroxila, podem existir sob quatro espécies diferentemente carregadas no estado S_0 , catiônica, anfólitica, monoaniônica e dianiônica. Os equilíbrios são determinados por três pK_a . O grupo hidroxila perde o próton na região de pH, participando do primeiro equilíbrio de dissociação ácida (WOLFBEIS & FURLINGER, 1982; VERT *et al.*, 1984). A figura 6 representa os equilíbrios de dissociação do alcalóide harmalol.

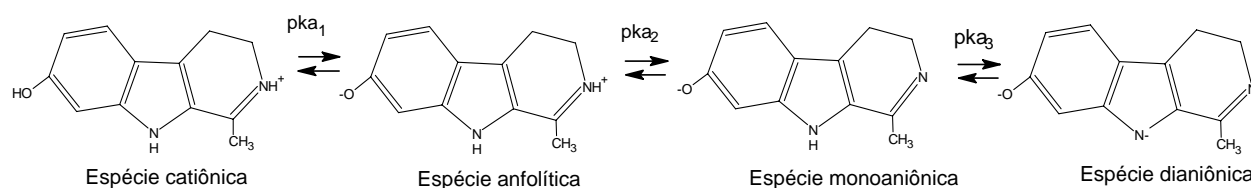


Figura 6. Equilíbrio de dissociação do harmalol. (Adaptado de PICADA, 1997).

1.2.2 As β -carbolinas e o sistema nervoso

As β -carbolinas atuam sobre o sistema nervoso central, inibindo a enzima monoamino-oxidase tipo A-MAO A (ROMMELSPACHER *et al.*, 1994; KIM *et al.*, 1997). As enzimas da MAO encontram-se na membrana externa das mitocôndrias, localização essa que normalmente protege as monoaminas endógenas contra sua ação oxidativa, mantendo os respectivos teores teciduais dentro dos limites fisiológicos. Devido a isto, a administração de inibidores da MAO (IMAO) acarreta aumento dos depósitos destas aminas, principalmente da dopamina, noradrenalina e serotonina, no cérebro. Conseqüência deste efeito inibitório é um estado de excitação, euforia, aumento da atividade psicomotora (efeito antidepressivo), entre outros (RANG *et al.*, 1997).

Acredita-se que o efeito alucinógeno das β -carbolinas, além de ocorrer devido à inibição da MAO, aconteça também devido à similaridade estrutural dos mesmos com aminas indólicas, como a triptamina e serotonina. Alguns estudos demonstraram que as β -carbolinas interagem com moderada afinidade com receptores do sistema nervoso central. Esses alcalóides ligam-se com relativa afinidade a receptores cerebrais de serotonina como a 5-hidroxitriptamina, subtipos 5-HT_{2C}, e 5-HT_{2A}, e receptores imidazólicos. Esta afinidade é altamente dependente dos substituintes no núcleo indólico e também da saturação do anel piridínico (GRELLA *et al.*, 1998; GLENNON *et al.*, 2000; HUSBANDS *et al.*, 2001). Em

relação aos receptores de serotonina 5HT_{1A}, receptores de dopamina D₁ e D₂ e receptores benzodiazepínicos, as β -carbolinas interagem com pouca afinidade (PIMPINELLA & PALMERY, 1995; GLENON *et al.*, 2000).

DU *et al.* (1997) demonstraram que a harmalina inibe competitivamente a ligação de MK801 a receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) em ratos. Vários estudos têm demonstrado que receptores glutamatérgicos tipo NMDA são importantes para indução da plasticidade sináptica e formação de memória (CASTELLANO *et al.*, 2001; ROESLER *et al.*, 1999; RIEDEL *et al.*, 2003; ROESLER *et al.*, 2003). O receptor NMDA funcional permite o ingresso de cálcio à célula através dele (IZQUIERDO, 2002). Além disso, harmalina e harmano estão envolvidos na homeostase de Ca²⁺ (SPLETTTOESSER *et al.*, 2005), através da regulação de voltagem de canais de cálcio, afetando assim a transmissão sináptica. O cálcio (Ca²⁺) é um segundo mensageiro universal em células eucarióticas e tem um papel essencial na comunicação sináptica (AGRAWAL *et al.*, 1996; YAMAUCHI, 2005). O aumento de cálcio intracelular estimula, direto ou indiretamente, uma série de enzimas chamadas proteínas cinases pertencentes a rotas de sinalização celular envolvidas na consolidação da memória. Entre elas, cita-se a proteína cinase cálcio-calmodulina dependentes (CaMKII), proteína cinase cálcio dependente (PKC), proteína cinase dependente de GMPc (PKG), proteína cinase dependente de AMPc (PKA) e proteína cinase ativada por mitógenos (MPKA) (WALZ *et al.*, 1999; IZQUIERDO *et al.*, 1999; VIANNA *et al.*, 2000; IZQUIERDO, 2002; QUEVEDO *et al.*, 2004).

1.2.3 β -carbolinas e ação antioxidante

Precusores indólicos das β -carbolinas, como triptofano e triptaminas, são conhecidos por possuírem atividade antioxidante (UEMURA *et al.*, 1988; CHRISTEN *et al.*, 1990), possivelmente por uma ação de detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ERO). As β -carbolinas, por sua vez, possuem propriedades semelhantes (TSE *et al.*, 1991). Harmalol, harmalina, harmol e harmina inibiram a peroxidação lipídica em preparações microssomais hepáticas de ratos, agindo como seqüestradores de radicais livres. Segundo TSE *et al.* (1991) esta ação antioxidante e sua relativa eficácia são altamente dependentes das modificações estruturais no anel β -carbolínico. Estes autores demonstram que a substituição do grupo hidroxil pelo grupo metoxil (harmalol para harmalina; harmol para harmina) e a desidrogenação do anel piridínico (harmalol para

harmol; harmalina para harmina) reduzem drasticamente a eficácia antioxidante *in vitro* das β -carbolinas.

A neuroproteção destes alcalóides foi documentada em estudos que utilizam modelos experimentais de doenças crônicas degenerativas, incluindo os modelos de indução de Parkinsonismo MPTP (N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina), 6-OHDA (6-hidroxi-dopamina) e dopamina (LEE *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2003). A dopamina, dentro dos neurônios nigrais, sofre autooxidação espontânea para neuromelanina, processo este que produz radical livre. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido da síntese de dopamina pela tirosina hidroxilase, bem como a desaminação da dopamina pela monoamino oxidase, podem estar envolvidos no progresso da doença de Parkinson (GRAHAM *et al.*, 1984; RABINOVIC & HASTINGS, 1998). As β -carbolinas harmalina, harmalol e harmina preveniram os danos mitocondriais e a morte de células PC12 induzida pela dopamina através de ação seqüestradora de ERO e da inibição da monoamino oxidase (LEE *et al.*, 2000). KIM *et al.* (2001) demonstraram que, além do efeito protetor contra dopamina, as β -carbolinas exibem efeito protetor contra 6-OHDA, a qual atua inibindo a cadeia transportadora de elétrons induzindo uma síndrome parecida com doença de Parkinson (GLINKA & YODIM, 1995; PRZEDBORSKI & JACKSON-LEWIS, 1998).

MPTP, através do seu metabólito ativo MPP^+ , inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons, resultando em prejuízo na produção de ATP, perda do potencial de membrana mitocondrial e formação de espécies reativas de oxigênio, produzindo assim uma síndrome semelhante a Parkinson, irreversível e severa (FORNAI *et al.*, 1996; CASSARINO *et al.*, 1998). As β -carbolinas reduzem a perda de viabilidade induzida por MPTP em células PC12 pela atenuação da mudança de permeabilidade da membrana mitocondrial e pela ação seqüestradora sobre ERO (LEE *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2003).

1.2.4 Outras propriedades farmacológicas e efeitos genotóxicos

A administração de harmina e harmalina induz excitação, tremores e ataxia em gatos, macacos, coelhos e camundongos (FUENTES & LONGO, 1971; MEERT, 1994). Harmina produziu bradicardia e hipotensão em gatos, cães, ratos e seres humanos; os gatos apresentaram ainda apnéia e arritmias ventriculares (SLOTKIN & DISTEFANO, 1970; AARONS *et al.*, 1977). Em animais, o harmano também produz depressão locomotora, tremores e convulsões (ERGENE & SCHOENER, 1993).

Outros efeitos com estes alcalóides também foram observados. PERES (1999) demonstrou que harmano, harmina, harmol, harmalol e harmalina apresentaram atividade imunossupressora *in vitro* em linfócitos periféricos humanos.

Efeitos tóxicos e mutagênicos dos alcalóides β -carbólicos foram demonstrados em células procariotas e eucariotas, sendo que a toxicidade destes alcalóides é dependente da estrutura e da concentração dos mesmos. O harmano induz resposta SOS (responsável pelo reparo do DNA) em bactérias, como a *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (ODA *et al.*, 1988; PICADA *et al.*, 1997). Este alcalóide também induz troca de cromátides irmãs (SCE) em linfócitos periféricos humanos (MADLE *et al.*, 1981) e em células linfoblastóides humanas (THODA *et al.*, 1983). Harmina aumentou a frequência de micronúcleos (MN) e de troca de cromátides irmãs (SCE) em células meristemáticas de *Allium cepa*, em presença de luz ultra-violeta (HAZEN & GUTIÉRREZ-GONZÁLVEZ, 1988; SASAKI *et al.*, 1992). Mais recentemente, foi demonstrado que harmano e harmina produzem aberrações cromossômicas em células de pulmão de hamster Chinês (V79) (BOEIRA *et al.*, 2001). Estes alcalóides também induziram mutações por alteração no quadro de leitura em bactérias (PICADA *et al.*, 1997) e na levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando em fase exponencial de crescimento (BOEIRA *et al.*, 2002). Os efeitos mutagênicos observados podem ser devidos à interação dos alcalóides com enzimas topoisomerases (FUNAYAMA *et al.*, 1996; DEVEAU *et al.*, 2001), além de serem agentes intercalantes do DNA (DUPORTAIL *et al.*, 1975; HAYASHI *et al.*, 1977; TAIRA *et al.*, 1997).

2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Os radicais livres são responsáveis pelo estresse oxidativo que pode originar processos fisiopatológicos como envelhecimento, aterosclerose, inflamação, doenças hepáticas, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, vários tipos de câncer, entre outros. Nos últimos anos, tem sido constante o interesse na busca de soluções para que seja evitada a formação dessas espécies reativas (radicais livres), ou então soluções que impeçam a ação dessas espécies sobre a célula, danificando-a.

Vários nomes têm sido empregados para descrever os radicais livres, ou espécies reativas de oxigênio (ERO), no entanto nenhuma contempla a variedade de moléculas de interesse. Será usado o termo ERO, abrangendo coletivamente os radicais livres e os derivados não radicais potencialmente oxidantes (por exemplo, o H_2O_2). Os alvos de ataque das ERO são os lipídios (peroxidação lipídica), proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (DNA) (HENRIQUES *et al.*, 2001).

2.1 Fontes de ERO nos sistemas biológicos

Os radicais livres são produzidos normalmente nos seres vivos como consequência de diversos processos metabólicos, que envolvem reações de transferência de elétrons. A fonte mais comum de radicais livres nos organismos aeróbicos ocorre durante as transferências de elétrons na mitocôndria pela cadeia respiratória, que utiliza o oxigênio molecular para obtenção de energia química em forma de adenosina trifosfato (ATP) (BOVERIS, 1998). Durante a geração oxidativa de energia na respiração mitocondrial 95% do oxigênio consumido pelas células é metabolizado na mitocôndria, onde é reduzido à água. Contudo 2 a 5% do oxigênio sofre redução incompleta, produzindo espécies parcialmente reduzidas, entre elas $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , as quais são resultantes respectivamente da redução de um, dois e três elétrons (figura 7) (BOVERIS, 1998; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

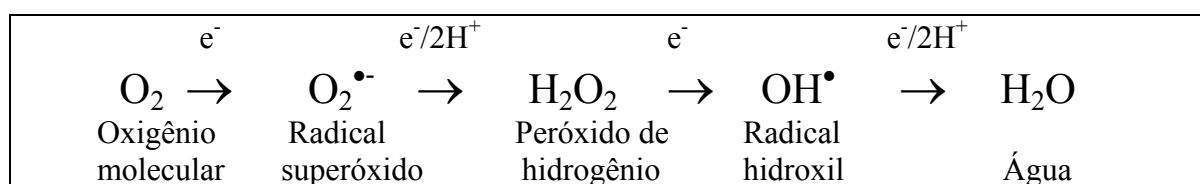


Figura 7. Redução univalente da molécula de oxigênio. (Adaptado de BOVERIS, 1998).

Outros processos do metabolismo também podem gerar ERO, tais como autoxidação de pequenas moléculas (hidroquinonas, leucoflavinas, catecolaminas, ferredoxinas) e fagocitose, durante a ação bactericida de neutrófilos e outros fagócitos. Fatores ambientais, como irradiação, poluição ambiental e produtos tóxicos são potenciais geradores de ERO (HENRIQUES *et al.*, 2001).

2.2 Radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

O radical superóxido é o produto da redução monovalente do oxigênio molecular (O_2), gerado normalmente durante o metabolismo aeróbico. Ele também pode ser gerado através da auto-oxidação, via interação com agentes redutores celulares (NADH, glutatona e outros) e via ação de diferentes compostos químicos como o paraquat e óxido de 4-nitroquinoleína (4NQO) (BOVERIS, 1998; HENRIQUES *et al.*, 2001). Além destes, o radical superóxido pode ser formado por algumas células especializadas na produção de ERO como, por exemplo, os fagócitos (macrófagos e neutrófilos), que por ação de uma oxidase que transfere elétrons do NADPH para o O_2 produzem $O_2^{\bullet-}$ e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para defesa bactericida (FORMAN & THOMAS, 1986).

2.3 Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre, pois não possui elétron desemparelhado na última camada, mas é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o OH^{\bullet} . O H_2O_2 é um intermediário reativo do oxigênio que se torna perigoso pelo alcance que tem. Por não reagir imediatamente, pode migrar pela célula e atingir alvos distantes da sua formação: é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas à Fe^{+2} e Fe^{+3} (IZAWA *et al.*, 1995).

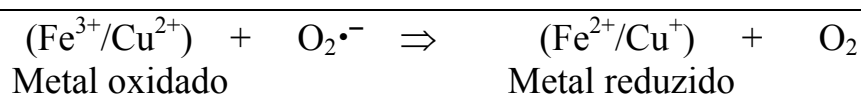
2.4 Radical hidroxila (OH^{\bullet})

Os efeitos mais tóxicos provocados pela formação tanto do $O_2^{\bullet-}$ quanto do H_2O_2 é a subsequente e rápida formação do radical hidroxil (OH^{\bullet}). O OH^{\bullet} é facilmente gerado a partir de H_2O_2 através da reação de Fenton na presença de íons metálicos como Fe^{+2} ou Cu^{+1} (FRIDOVICH, 1998).

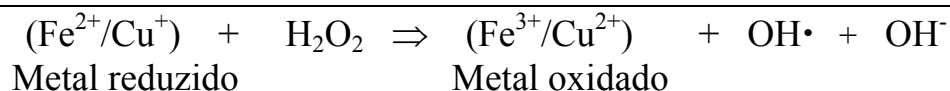
O radical OH^{\bullet} é considerado a ERO mais reativa em sistemas biológicos. A combinação extremamente rápida do OH^{\bullet} com metais e outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Os metais de transição, tais como ferro (Fe^{2+}) e cobre (Cu^+) aumentam a velocidade da produção de OH^{\bullet} (FREITAS &

MENEGHINI, 2001). A reação envolvendo metais ocorre em etapas: em um primeiro passo, o metal na sua valência mais alta (Fe^{3+} ou Cu^{2+}) reage com o radical $\text{O}_2^{\bullet-}$, produzindo íon metálico, ferroso (Fe^{2+}) ou cuproso (Cu^+) e oxigênio molecular (Reação de Haber-Weiss) (figura 8) deixando o metal em uma valência menor. Estes íons reagem rapidamente com H_2O_2 , gerando radical hidroxil (OH^{\bullet}), íon hidroxil (OH^-) e Fe^{3+} (Reação de Fenton) (figura 8).

Reação de Haber-Weiss



Reação de Fenton



A soma das reações acima resulta na Reação de Haber-Weiss/Fenton

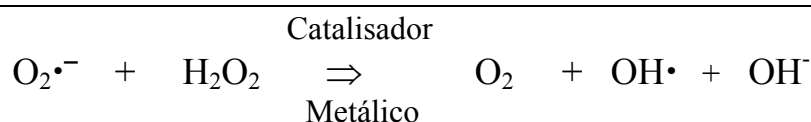


Figura 8. Representação da formação do radical OH pelas reações Haber-Weiss/Fenton. (Adaptado de HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

O radical OH^{\bullet} tem uma meia vida extremamente curta e sua difusão é limitada pela sua velocidade de reação. Por isso, a melhor defesa que a célula tem contra este radical é evitar que o mesmo seja gerado. Por esta razão as células mantêm um rígido controle da homeostase metálica. O transporte de metais é altamente regulado e os íons de metais são mantidos em sua valência mais alta ou estão de alguma forma complexados a enzimas e proteínas onde são armazenados ou fazem parte funcional das mesmas (revisado por HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000; FRIDOVICH, 1998).

2.5 Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)

É a forma excitada de oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. O oxigênio singlete tem importância em certos eventos biológicos, mas poucas doenças foram relacionadas a sua presença (HENRIQUES *et al.*, 2001). Pode ser gerado pelos fagócitos, por indução luminosa, por reações catalisadas por peroxidases e outras (CADENAS, 1989).

2.6 Radicais alcoxil (RO^\bullet) e peroxil (ROO^\bullet)

Estes radicais podem originar-se pela ação de um radical livre de oxigênio sobre as cadeias dos ácidos graxos polinsaturados. Os radicais peroxil são conhecidos por serem menos reativos e mais seletivos que os radicais OH^\bullet . Eles são a origem das reações em cadeia que constituem o processo de base de lipoperoxidação das membranas celulares (GARCIA *et al.*, 2000).

2.7 Radical hidroperoxil (HO_2^\bullet)

Representa a forma protonada do radical superóxido, ou seja, possui o próton hidrogênio. Existem evidências de que o hidroperoxil é mais reativo que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990).

2.8 Danos oxidativos a biomoléculas

As ERO são capazes de danificar inúmeras biomoléculas, tais como lipídios (peroxidação lipídica), proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (DNA e RNA) comprometendo desta forma a integridade celular (PERES, 1999; HENRIQUES *et al.*, 2001). O radical OH^\bullet pode inativar várias proteínas, ao oxidar seus grupos sulfidril (-SH) a pontes dissulfeto (-S-S-). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação). Já o radical superóxido oxida centros metálicos [4Fe-4S] de desidratases, como aconitase, liberando o Fe^{+2} , o qual serve de catalisador para formação do radical OH^\bullet via reação de Fenton (FRIDOVICH, 1998).

No DNA, as ERO produzem uma série de lesões, danificando bases, desoxiriboses, causando quebras simples de cadeia, criando sítios apurínicos e apirimidínicos (sítios AP) e ligações cruzadas entre DNA e proteínas (WANG *et al.*, 1998; LAVAL *et al.*, 1998). Sabe-se que nem o radical superóxido nem o peróxido de hidrogênio atacam o DNA diretamente, porém o radical OH^\bullet e o oxigênio singlete podem provocar lesões diretas ao DNA (FRIDOVICH *et al.*, 1998; CADET *et al.*, 1999; MEEHAN *et al.*, 1999). O alvo preferencial do ataque das ERO parece ser a guanina, devido à oxidação do átomo C8, forma-se o produto 7,8-diidro-8-2'-desoxiguanina (8-OXO-G), que é o produto de dano oxidativo melhor caracterizado, sendo fortemente mutagênico *in vitro* e *in vivo*, causando transversões G→T quando não reparado (CADET *et al.*, 1999; BROZMANOVÁ *et al.*, 2001).

3. SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTES

Para defender-se das ERO e manter a integridade celular, os organismos possuem diversos sistemas de defesa antioxidante. As estratégias de defesa compreendem três etapas, que são: a prevenção (evitar a formação de ERO), interceptação (neutralização de ERO geradas) e reparação (de danos ocasionados por ERO) (ROSS & MOLDEUS, 1991; DEMPLE & HARRISON, 1994). A prevenção contra a formação de ERO é representada, por exemplo, pelos sistemas de homeostase metálica na prevenção ao estresse oxidativo. A interceptação pode ser representada pelos sistemas enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) ou não enzimáticos (glutathione, vitaminas, compostos fenólicos), que impedem a continuação das reações em cadeia. Por último, quando o dano já estiver ocorrido, existem sistemas capazes de repará-lo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). Além destes, existem mecanismos de regulação da capacidade antioxidante que modulam a manutenção e a adaptação de níveis adequados de defesa às espécies reativas de oxigênio (SIES, 1997; SEN & PACKER, 1996). Algumas das defesas antioxidantes celulares estão representadas na figura 9.

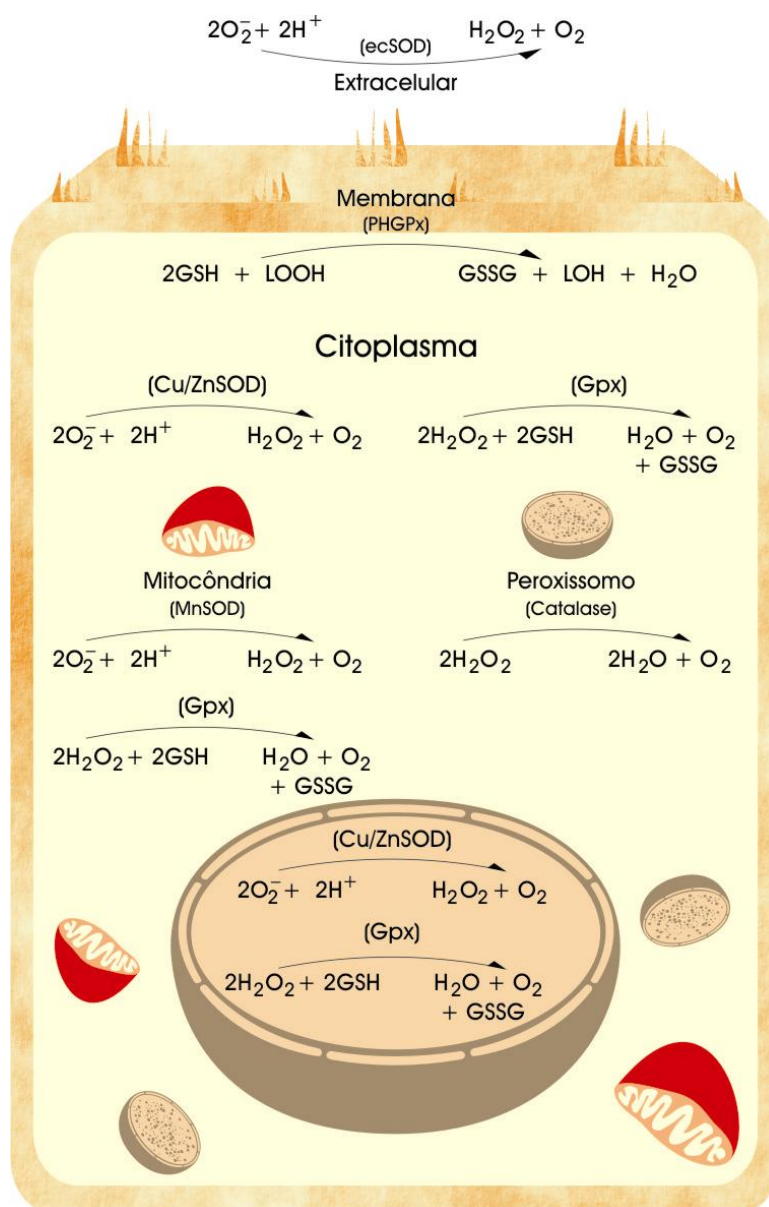


Figura 9. Vias endógenas de destruição das espécies reativas de oxigênio (ERO), onde é mostrada a localização subcelular das principais vias de destruição enzimática de ERO. (Adaptado de ENGELHART, 1999).

3.1 Superóxido dismutase (Sod)

São metalo-enzimas abundantes em células aeróbicas que agem sobre o radical superóxido, dismutando-o a peróxido de hidrogênio. Corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Há várias isoenzimas do tipo Sod, geralmente responsáveis por compartimentos celulares distintos, podendo conter cobre, zinco, ferro ou manganês em seus sítios ativos (FREITAS *et al.*, 2000; HENRIQUES *et al.*, 2001). A SodCuZn, possui Cu^{2+} e Zn^{2+} , está presente principalmente

no citosol de células eucarióticas, mas também pode ser encontrada nos lisossomos, núcleos, bem como no espaço entre as membranas mitocondriais externa e interna (CRAPO *et al.*, 1992; LIOU *et al.*, 1993; LONGO *et al.*, 1996). A SodMn, com um íon de Mn^{3+} em cada uma de suas subunidades, está localizada primariamente na mitocôndria. A SodFe possui um íon Fe^{2+} em seu sítio ativo e é a Sod constitutiva da maioria dos organismos eucariotos (FRIDOVICH, 1998).

3.2 Catalase (Cat)

A catalase é uma hemoproteína que catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio para $2 H_2O$ e O_2 . A ação desta enzima envolve a oxidação divalente do ferro heme (IV), acompanhada da redução divalente do peróxido de hidrogênio. Elas contêm NADPH fortemente ligado, o qual pode prevenir a acumulação da forma ferro (IV) da enzima, a qual é inativa (HENRIQUES *et al.*, 2001). Em células eucarióticas, há catalases citosólicas e perioxossomais (FRIDOVICH, 1998).

3.3 Glutathiona, glutathiona peroxidase (GSH-Px) e glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona é um tripeptídeo (γ -glutamil-cisteinil-glicina), um tiol (SH-) não protéico importante na proteção celular contra formação de ERO, na homeostase tiólica, na manutenção do balanço redox da célula, e para defesa contra agentes xenobióticos. Participa também da regulação alostérica de enzimas e no transporte de aminoácidos. Uma série de enzimas como a glutathiona peroxidase, glutathiona-S-transferase, glutaredoxina e proteína dissulfeto isomerase utilizam a glutathiona como substrato (OTHAKE & YABUUCHI, 1991; LISOWSKY, 1993; BRENDEL *et al.*, 1998).

A glutathiona peroxidase (GSH-Px) catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos a seus correspondentes álcoois às custas da conversão da glutathiona reduzida (GSH) ao dissulfeto correspondente glutathiona oxidada (GSSG). Está presente no citosol de mamíferos, sendo a principal defesa contra peróxidos. A especificidade da GSH-Px inclui não somente eliminação de H_2O_2 , mas também a redução de alquil-hidroperóxidos a seus respectivos álcoois (INOUE *et al.*, 1998).

A glutathiona reduzida está presente na maioria das células e é o tiol mais abundante no meio intracelular. Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento $-SH$, presente na cisteína. Ela, reduzida, pode ser considerada um dos agentes mais importantes

do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, radiação e luz ultravioleta (IZAWA *et al.*, 1995).

4. A LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* COMO MODELO DE ESTUDO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um fungo unicelular com ciclo eucarioto típico e completo, tem sido amplamente estudada, tornando-se ferramenta importante nas pesquisas sobre mutagênese, reparo de DNA e mecanismos que respondem ao estresse oxidativo (MARIS *et al.*, 2001; BOEIRA *et al.*, 2002; PUNGARTNIK *et al.*, 2002).

A *S. cerevisiae* pertence ao grupo das leveduras anaeróbicas facultativas. Isto significa que irá fermentar hexoses como a glicose e a frutose, tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas de crescimento. A glicose é a fonte preferencial de carbono, e é mediada por um processo de repressão e ativação de genes e proteínas, usualmente conhecido como “repressão da glicose” ou “repressão catabólica” (revisado por DE WIND *et al.*, 1997; GANCEDO, 1998). Na presença de concentrações acima de um valor chamado de concentração típica, a glicose reprime a expressão dos genes que codificam enzimas do ciclo de Krebs, enzimas da cadeia respiratória e estruturas mitocondriais. A via a ser seguida pelo piruvato, neste caso, é a anaeróbica com formação de etanol, encontrando-se reduzida a atividade mitocondrial na levedura. Em concentrações de glicose abaixo da concentração crítica (0,2% no meio) e em presença de O₂, o piruvato seguirá a via aeróbica, a *S. cerevisiae* possuirá alta atividade mitocondrial, pois os genes em questão não estarão reprimidos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

A *S. cerevisiae* possui um perfil de crescimento característico. A fase “lag” corresponde a uma fase de adaptação fisiológica das células ao novo meio de cultura no qual foram introduzidas. Nesta fase, o metabolismo das células está ativo, sintetizando enzimas e coenzimas, criando condições para que elas possam se dividir, embora as células ainda não estejam se dividindo. Na fase exponencial, o número de células aumenta exponencialmente com o tempo com energia proveniente da fermentação. Ao diminuir a disponibilidade de glicose no meio, ocorre a desrepressão catabólica (transição diáuxica), com uma parada transiente na divisão celular, enquanto as células são preparadas para o metabolismo respiratório. Após, reassume a divisão celular em ritmo mais lento, utilizando

etanol como fonte de carbono, produzido durante a fermentação (fase pós-diáuxica). Quando todas as fontes de carbono forem exauridas, as células entram na fase estacionária, na qual podem sobreviver por muito tempo na ausência de nutrientes (PRINGLE & HARTWELL, 1982; FUGE & WERNER-WASHBOURNE, 1997).

4.1 Defesas antioxidantes e testes de sensibilidade em *S. cerevisiae*

S. cerevisiae apresenta uma variedade de mecanismos de defesas antioxidantes. Possui duas enzimas superóxidos dismutases: SodCuZn, codificada pelo gene *SOD1*, localizada no citoplasma; e a SodMn, codificada no núcleo pelo gene *SOD2* e que é localizada na mitocôndria (GRALLA & KOSMAN, 1992; LONGO *et al.*, 1999). Ambas enzimas fazem a dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio. Duas catalases foram identificadas, uma citosólica codificada pelo gene *CTT1* e outra perioxossomal codificada pelo gene *CTA1*. Leveduras mutadas para ambas as catalases são sensíveis a estresse por elevadas concentrações de H₂O₂ (IZAWA *et al.*, 1996).

O peróxido de hidrogênio também pode ser neutralizado por peroxidases. A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo que desempenha papel fundamental na proteção das células contra danos oxidativos (MEISTER, 1995). O gene *GSH1* codifica para a γ -glutamil-cisteinil sintetase, a enzima responsável pelo primeiro passo e ponto limitante da síntese do tripeptídeo glutathiona (OTHAKE & YABUUCHI, 1991; LISOWSKY, 1993; BRENDEL *et al.*, 1998; INOUE *et al.*, 1998).

O fator de transcrição Yap1, homólogo ao fator humano AP1, é apontado como um dos mais importantes mediadores das respostas adaptativas em *S. cerevisiae*, modulando a transcrição de genes envolvidos na defesa contra oxidantes como o H₂O₂ e a geradores de radicais superóxido (SCHNELL *et al.*, 1992; MEISTER, 1995). Yap1 parece regular genes de forma direta e indireta. Alguns alvos da regulação direta que foram identificados são os genes *TRX2*, um dos dois genes que codificam a tioredoxina em *S. cerevisiae* (KUGE & JONES, 1994); *GSH1*, que codifica para a γ -glutamil-cisteinil-sintetase (WU-AL & MOYE-ROWLEY, 1994); *TRR1*, que codifica para tioredoxina redutase (MORGAN *et al.*, 1997); *GLR1* que codifica a GSSG-redutase (GRANT *et al.*, 1996a; 1996b). Provavelmente dois membros da superfamília de transportadores envolvidos na resistência múltipla a drogas (MDR): *FLR1*, que codifica um transportador de membrana plasmática e, *YCF1* que codifica um transportador de conjugados cádmio-glutathiona (Cd-SG) para dentro

do vacúolo (WEMMIE *et al.*, 1994; ALARCO *et al.*, 1997; BAUER *et al.*, 1999). Algumas respostas mediadas por Yap1 exigem uma cooperação de outro fator de transcrição, o fator Skn7 (LEE *et al.*, 1999; DORMER *et al.*, 2002).

Linhagens isogênicas de *S. cerevisiae* deficientes em defesas antioxidantes têm sido utilizadas para o estudo do mecanismo de ação de agentes físicos e químicos que interferem com o estado redox da célula (BRENNAN & SCHIESTK, 1998; LEE *et al.*, 2001). Um método utilizado para determinação da natureza das lesões induzidas por agentes oxidantes, consiste em comparar a sensibilidade de mutantes deficientes em enzimas antioxidantes com uma linhagem selvagem isogênica proficiente naquele tipo de defesa antioxidante. Pode-se também combinar um oxidante conhecido, como H₂O₂ e paraquat, com uma substância com potencial antioxidante, e avaliar o efeito do tratamento na modulação do estresse. O aumento da viabilidade celular ao tratamento está sugerindo atividade protetora (antioxidante) e a diminuição da viabilidade a um efeito deletério (HENRIQUES *et al.*, 2001; PICADA *et al.*, 2003).

4.2 Testes de mutação *forward*

Os ensaios com levedura têm sido de grande utilidade na determinação de agentes mutagênicos ambientais ou farmacológicos e servem para complementar os ensaios de mutagenicidade realizados em bactérias (HENRIQUES *et al.*, 1987; POLI *et al.*, 1999; TERZIYSKA *et al.*, 2000). As mutações são detectadas através da expressão fenotípica, causada por uma mudança súbita e hereditária no genótipo do organismo, alterando suas características. A ocorrência de mutações, no entanto, depende da natureza da lesão e das respostas celulares aos danos no DNA, podendo assim ser dividida em dois grupos: mutações gênicas e cromossômicas. As mutações gênicas são alterações que ocorrem na seqüência de nucleotídeos do DNA e as cromossômicas são as que produzem alterações no número ou estrutura dos cromossomos (WATERS *et al.*, 1999; MACGREGOR *et al.*, 2000; DEARFIELD *et al.*, 2002).

Alterações gênicas, resultantes de um tratamento mutagênico, podem ser facilmente quantificadas usando-se um marcador fenotípico, como por exemplo, a sensibilidade à canavanina. Muitas linhagens selvagens expressam um transportador de arginina chamado Can1p. A canavanina é um análogo estrutural tóxico da arginina (figura 10). O mesmo transportador que internaliza a arginina, faz a importação de canavanina do ambiente

levando as células à morte. Neste sentido, alterações no gene *CANI*, induzidas por drogas mutagênicas podem aumentar a sobrevivência das células em presença de canavanina quando comparadas a tratamentos não mutagênicos (BRENDDEL & HENRIQUES, 2001; HUANG *et al.*, 2003).

A linhagem N123 permite a detecção deste tipo de mutação, chamada mutação *forward* (REVERS *et al.*, 2002). As células revertentes podem ser detectadas pelo semeamento em placas contendo meio seletivo na presença de canavanina.

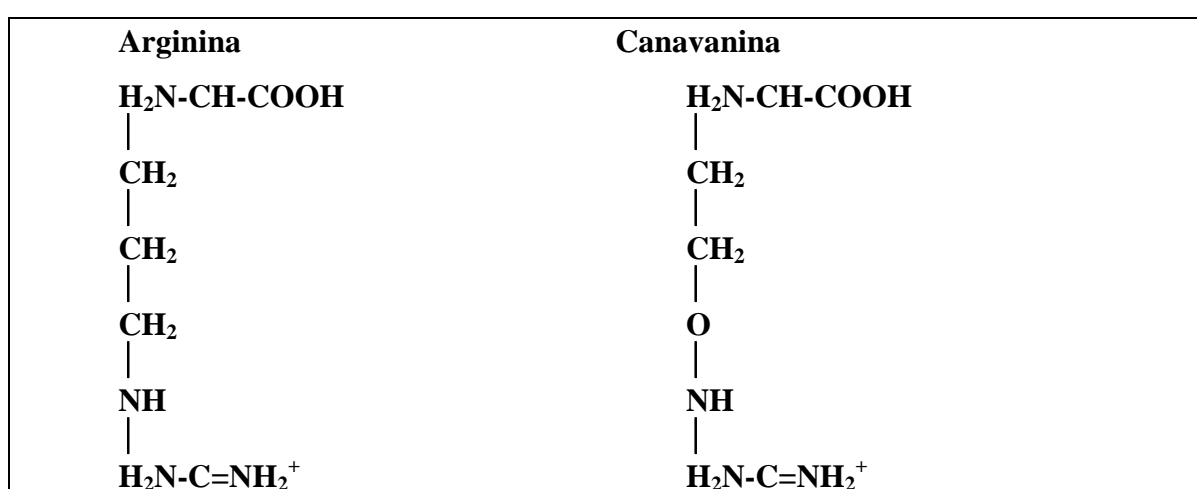


Figura 10. Estrutura química dos análogos arginina e canavanina.

5. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIGENOTÓXICA

Os ensaios em células de mamíferos são freqüentemente citados como sendo os mais relevantes para a análise do potencial genotóxico de agentes químicos e físicos (TICE *et al.*, 1994; MÜLLER & SOFUNI, 2000). Os organismos preferidos para análise *in vivo* e *in vitro* são os roedores, devido a uma correlação elevada entre mutações em humanos e roedores (TICE *et al.*, 1994; MACGREGOR *et al.*, 2000).

Células V79, fibroblastos de pulmão de hamster Chinês, correspondem a uma das linhagens de células de mamíferos mais utilizadas em testes citogenéticos de curta duração (BRADLEY *et al.*, 1981). Em geral, o tempo de duplicação destas células é de 12-16 horas, a 37°C, com 5% de CO₂. Apresentam um cariótipo estável com 22 ± 1 cromossomos

(de fácil identificação através de microscópio óptico) e uma baixa frequência de mutações (BRADLEY *et al.*, 1981).

Alterações metodológicas dos testes de genotoxicidade podem ser empregadas para identificar compostos que estariam envolvidos na proteção do DNA, através de uma atividade antigenotóxica (WEISBURGER, 2001). Neste sentido utilizamos o ensaio cometa para determinar o potencial anti-genotóxico em células de mamífero.

O ensaio Cometa ou teste de eletroforese para célula única em gel (SCGE - *single cell gel electrophoresis*) é uma técnica simples, rápida e sensível, para mensurar e analisar lesões e detectar efeitos de reparo no DNA (SINGH *et al.*, 1988; FAIRBAIRN *et al.*, 1995) em células individuais expostas a agentes genotóxicos. Os danos mais facilmente detectados no DNA são quebras (simples ou duplas), danos alcali-lábeis, ligações cruzadas e quebras resultantes de reparo por excisão não concluído (SINGH *et al.*, 1988; FAIRBAIRN *et al.*, 1995; SPEIT & HARTMANN, 1999; MERK & SPEIT 1999; ALBERTINI *et al.*, 2000).

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

A técnica consiste em dispor as células embebidas em gel de agarose sobre lâminas para microscopia. As mesmas são então lisadas sob condições alcalinas (ou neutras), faz-se uma eletroforese que faz migrar para fora do núcleo os segmentos de DNA livres, resultantes das quebras. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano reconhecível no DNA. As células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, como de um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. Estes fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos e, ainda estarem associados ao núcleo por uma cadeia simples (FAIRBAIRN *et al.*, 1995). A identificação do dano pode ser feita através da medida do comprimento do DNA migrante ou também pela classificação visual das células em diferentes classes (0-4) através de análise microscópica, podendo obter um valor arbitrário que expresse o dano geral que

uma população de células sofreu (COLLINS *et al.*, 1997; BOEIRA, 2001; PICADA, 2003).

8. ESTUDO DE MEMÓRIA DE CURTA E LONGA DURAÇÃO

A memória é a aquisição, a formação, a conservação e a evocação de informações (IZQUIERDO, 1989; IZQUIERDO & MEDINA, 1997; CAHILL *et al.*, 2001). A consequência dos processos envolvidos na memória seria a aprendizagem (aquisição de novas memórias) e formação de um novo comportamento, ou modificação de um pré-existente. Pode-se definir memória como a conservação e evocação de informações adquiridas através de experiências vividas (IZQUIERDO & MCGAUGH, 2000). A capacidade de adquirir novas informações é uma das mais importantes funções do sistema nervoso e a expressão de memórias previamente adquiridas é crucial para a evolução das espécies (MCGAUGH, 2000).

De acordo com o tempo durante o qual são armazenadas, as memórias podem ser divididas em dois tipos principais: memórias de curta duração (“*Short-term memory – STM*”) e memória de longa duração (“*Long-term memory – LTM*”). As STM são aquelas retidas dentro de alguns segundos até algumas horas após o aprendizado e as LTM são aquelas cuja consolidação é mais demorada e persistem dias, anos ou mesmo uma vida inteira (IZQUIERDO *et al.*, 1998; IZQUIERDO *et al.*, 1999; BIANCHIN *et al.*, 1999; ROSA *et al.*, 2004).

Acredita-se que o substrato neural das memórias, tanto de curta quanto de longa duração, reside em alterações nas conexões sinápticas entre neurônios de regiões cerebrais específicas e a natureza de tais modificações induzidas pela aquisição de novas memórias tem atraído muita atenção nas últimas décadas (IZQUIERDO & MEDINA, 1997; ROESLER *et al.*, 2000). Estudos dos mecanismos neurais das LTM demonstram que sua formação é um processo gradual que envolve substratos neuroanatômicos, celulares e moleculares específicos. LTM não são imediatamente adquiridas sob sua forma estável, sendo necessário serem consolidadas. Durante o período que se segue à sessão de aprendizado, enquanto as LTM são consolidadas, as STM são funcionais (GOELET *et al.*, 1986; IZQUIERDO *et al.*, 1998a; IZQUIERDO *et al.*, 1999; PICADA *et al.*, 2003).

Uma das tarefas de aprendizagem em roedores utilizada nesse trabalho é a tarefa de reconhecimento de objeto, indicada para investigação de alterações neuronais induzidas por drogas ou modificações genéticas. Nessa tarefa, o animal é exposto a um ambiente onde encontra dois objetos idênticos. É permitido ao animal um tempo de exploração de 5 minutos e o tempo em cada objeto é registrado. Após essa sessão treino, administram-se drogas ou realizam-se procedimentos. Após 1h30 min, para análise de STM e 24 h, para LTM, o animal retorna ao ambiente e encontra um objeto novo e um dos objetos antigos. Como reflexo da aprendizagem espera-se que o tempo gasto para exploração do novo objeto represente cerca de 75% do tempo total gasto na exploração dos elementos (RAMPON *et al.*, 2000; ROSA *et al.*, 2003).

II - OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Estudar a atividade antioxidante e antigenotóxica dos alcalóides β -carbolínicos em dois sistemas eucariotos: na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e em cultura de células de pulmão de hamster chinês (células V79). Também visa estudar os efeitos destes alcalóides sobre atividade comportamental em camundongos, como um reflexo da ação destes compostos na função neuronal.

2. Objetivos específicos

➤ Determinar a atividade dos alcalóides sobre o estresse oxidativo, utilizando diferentes linhagens da levedura *S. cerevisiae* selvagens e isogênicas, deficientes em produtos de genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo.

➤ Determinar a atividade antioxidante dos alcalóides *in vitro*, utilizando o sistema hipoxantina/xantina oxidase.

➤ Verificar ação antigenotóxica dos alcalóides, pela sua possível proteção a danos oxidativos induzidos no DNA de células de mamíferos em cultura (linhagem V79), utilizando o Ensaio Cometa.

➤ Verificar o efeito antimutagênico, pela capacidade dos alcalóides em reduzir a frequência de mutações induzidas por H_2O_2 na levedura *S. cerevisiae*.

➤ Estudar o efeito dos alcalóides β -carbolínicos e sua influência na aquisição, consolidação e evocação da memória em camundongos, utilizando tarefas experimentais relacionadas à memória de reconhecimento.

➤ Relacionar os efeitos biológicos encontrados com a estrutura dos alcalóides.

III – CAPÍTULO I

Antioxidant effects of β -carboline alkaloids in yeast *Saccharomyces cerevisiae* and mammalian cells (V79) exposed to oxidative stress conditions

(A ser submetido a Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis)

Antioxidant effects of β -carboline alkaloids in yeast *Saccharomyces cerevisiae* and mammalian cells (V79) exposed to oxidative stress conditions

Dinara Jaqueline Moura¹, Marc François Richter², Jane Marlei Boeira³, João Antonio Pêgas Henriques^{1,4}, Jenifer Saffi^{1,4} *

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

² Laboratório de Farmacocinética, Centro de Pesquisa em Ciências Médicas, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil

³ Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim, RS, Brasil

⁴ Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil

* Corresponding author. Laboratório de Genética Toxicológica, Avenida Farroupilha 8001, Bairro São José, CEP 92425-900, Canoas- RS, Brasil. Tel.: +55 51 34774000 ext. 2774 ; fax: +55 51 33167003.

E-mail address: jenifer.saffi@ulbranet.com.br (J.Saffi)

Abstract

The β -carboline alkaloids found in medical plants and in a variety of foods, beverages and cigarette smoke have range of action in various biological systems. *In vitro* studies have demonstrated that these alkaloids can act as scavengers of reactive oxygen species. In this paper, we report the *in vivo* antioxidative properties of the aromatic (harmane, harmine, harmol) and dihydro- β -carbolines (harmaline and harmalol), studied by using strains proficient and deficient in antioxidant defenses. Their antimutagenic activity was also assayed in *Saccharomyces cerevisiae* and the anti-genotoxicity was tested by the comet assay in V79 mammalian cells, when both eukaryotic systems were exposed to H₂O₂. We show that the alkaloids have a significant protective effect against H₂O₂ and paraquat oxidative agents in yeast cells and that their property of scavenging hydroxyl radicals contributes to their anti-mutagenic and anti-genotoxic effects.

Key-words: Oxidative stress; β -carboline alkaloids; Antimutagenicity; Yeast; Comet assay

1. Introduction

The β -carbolinic alkaloids are widely distributed, being found in several families of plants, such as Apocynaceae, Elaeagnaceae, Leguminosae, Passifloraceae and Zygophyllaceae [1]. They are also found in cigarette smoke, overcooked foods and wine [2,3,4,5]. Certain β -carbolines, such as harman, have been reported as normal constituents of human tissues and body fluids [6]. Others, like harmine and harmaline, are responsible for reported hallucinogenic effects of “ayahuasca”, a beverage prepared with *Banisteriopsis caapi* and *Ptychocheilichia viridis*, used for religious purposes in South America and Africa [7,8].

The metabolic pathway leading to the formation of β -carbolines is via Pictet-Spengler condensation between an indolamine (e.g. tryptamine) and aldehydes (e.g. acetaldehyde) [9]. The common chemical structure of the alkaloids used in this study is formed by one indole nucleus and by one pyrrole ring of six members. According to their oxidation state, they can be divided into two groups: dihydro- β -carbolines (harmaline and harmalol) and β -carbolines (harmane, harmine and harmol) (figure 1).

The β -carbolines have a wide spectrum of action, especially on muscular, cardiovascular and central nervous systems, including MAO inhibition [10,11,12], binding to benzodiazepine, serotonin, dopamine and imidazoline receptors [13,14,15,16,17], convulsive or anticonvulsive actions, anxiolytic, tremorogenic and immunomodulatory effects [18,19,20]. They are also DNA intercalating agents [21,22] and inhibit enzymes, e.g. DNA topoisomerases [23]. Moreover, toxic and mutagenic effects of these alkaloids have been reported in prokaryotic [24] and eukaryotic cells [8,25].

Some reports indicate that β -carbolines have effective antioxidant properties. Harmane, harmaline and harmalol showed antioxidant activity by inhibiting lipid peroxidation in microsomal hepatic preparation [9] and attenuated oxidative damage of hyaluronic acid, cartilage collagen and immunoglobulin G [26,27]. Harmaline, harmalol, harmine and harmol attenuate cerebral damage in mice by acting as scavengers of reactive oxygen species [28,29,30].

Free radicals, or reactive oxygen species (ROS), are responsible for oxidative stress that can initiate physiopathological processes such as aging, atherosclerosis, inflammation, hepatic diseases, Alzheimer and Parkinson's disease, several cancer types, etc.

[29,31,32,33]. In the last few years, interest has focused on finding solutions to protect cellular compounds against the action of ROS. It is thus important to evaluate the antioxidative properties, antimutagenicity and antigenotoxicity of the β -carboline alkaloids harmine, harmane, harmol, harmaline and harmalol. These putative protective effects have been assessed by survival assay in *Saccharomyces cerevisiae* strains proficient and deficient in antioxidant defenses and by mutagenicity assay using the yeast strain N123. A protective effect against oxidant-induced DNA damage was tested by the single-cell gel assay (Comet assay) in V79 cells.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The alkaloids harmane (CAS 21655-84-5; no specific purity), harmine (CAS 343-27-1; approximately 98% purity), harmol (CAS 149022-16-2; no specific purity) harmaline (CAS 6027-98-1; approximately 95% purity) and harmalol (CAS 6028-07-5; approximately 90% purity) hydrochlorides were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Harmine was dissolved in distilled water and harman, harmol, harmaline and harmalol in 5% dimethylsulfoxide (DMSO) and distilled water. The oxidant reagents hydrogen peroxide (H_2O_2) and paraquat were also purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). The appropriate concentrations were obtained by dilution of stock solution in distilled sterile water. The solvent controls included in the all assays were found to be negative.

2.2. Strains

The relevant genotypes of *S. cerevisiae* strains used in this work are listed in Table 1. We chose to work in the stationary phase of growth because this resembles most cells of multicellular organisms in important aspects: 1) most energy comes from mitochondrial respiration, 2) the cells have left the active cell cycle and have entered the G_0 phase and 3) damage accumulates over time [34,35].

2.3. Survival assays in *S. cerevisiae* strains

Stationary phase cultures of EG103 (WT) and mutant isogenic strains, as well as YPH98 (WT) and the isogenic mutant strain, were obtained by inoculation of an isolated colony into liquid YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose). To evaluate sensitivity to β -carboline alkaloids, cultures were exposed to concentrations varying from 25 to 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and incubated under growth conditions for 1 h in phosphate buffered saline (PBS) at 30°C. To verify the antioxidant activity of the alkaloids, cells were pre-treated in PBS with non cytotoxic concentrations of alkaloids and incubated for 1 h at 30°C. Cells were then washed and treated with paraquat or H_2O_2 in PBS for another hour. For survival determination, suitable aliquots were plated in triplicate on solid YPD. Plates were incubated at 30°C for 2-3 days before counting the colonies. All tests were repeated at least three-fold and plating was carried out in triplicate for each dose.

2.4. Antimutagenicity assay

S. cerevisiae N123 strain (listed in table 1) was used to assess alkaloid anti-mutagenicity against the oxidative mutagen H_2O_2 . The pre-incubation procedure was as follows: a suspension of 2×10^8 cells/mL in the stationary phase, grown in YPD (2% glucose), was incubated for 1 h at 30°C with various concentrations of alkaloids (10, 25 or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in PBS. Cells were harvested and washed once with saline; oxidative mutagen was then added and the mixture was further incubated at 30°C for another h. Then the cells were washed and suitable aliquots were plated in triplicate on solid SC (synthetic complete medium containing 0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, 0.5% ammonium sulfate, 2% agar and appropriate amino acids) with or without canavanine (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Plates were incubated in the dark at 30°C for 72 h before counting the survivors and revertant colonies. Assays were repeated at least three-fold and plating for each dose was in triplicate.

This assay uses a phenotypic marker, canavanine sensitivity. Many WT yeast strains express the arginine transporter Can1p, which also imports canavanine from the environment and leads to cell death. Thus, mutagen-induced alterations in the *CAN1* gene that impair Can1p functionality can increase cellular survival in the presence of canavanine when compared to a non-mutagenic cell sample.

2.5. Comet assay using V79 cells

Chinese hamster lung fibroblasts (V79 cells) were cultivated under standard condition in Dulbecco's modified Eagle's medium, supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 2mM L-glutamine and antibiotics [36]. Cells were maintained in tissue culture flasks at 36°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and were harvested by treatment with 0.15% trypsin and 0.08% EDTA in phosphate-buffered saline (PBS). 2x10⁵ cells were seeded into each flask and cultured one day prior to treatment. For the Comet assay the cells were treated for 2 h with alkaloids, followed by 0.5 h incubation with the oxidant H₂O₂. The culture flasks were protected from direct light during treatment with the alkaloids and H₂O₂.

The alkaline Comet assay was performed as described by Singh et al. [37] with minor modifications [38]. At the end of treatment, cells were washed with ice-cold PBS and trypsinized with 100 µL trypsin (0.15%). Immediately thereafter, cell suspensions (~10⁶ cells/mL) were added to low melting point agarose (LMA) and spread on agarose-precoated microscope slides. The cells were lysed (2.5M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris, pH 10.0, with freshly added 1 % Triton X-100 and 10 % DMSO) and an electric current of 300 mA and 25 V (0.90 V/cm) was applied for 15 min to electrophorese the DNA. Slides were stained with silver nitrate and analyzed using an optic microscope. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed per group. Cells were also scored visually into five classes, according to tail size (from undamaged-0, to maximally damaged-4).

International guidelines and recommendations for the Comet assay consider that visual scoring of comets is a well-validated evaluation method. It has a high correlation with computer-based image analysis. The damage index is based on the length of migration and on the amount of DNA in the tail and is considered a sensitive measure of DNA and of damage frequency, as the proportion of cells that show tails after electrophoresis. Image length or migration length gives information only about the size of DNA fragments and is largely dependent upon electrophoresis conditions (i.e. voltage and duration). Thus damage index (DI) and frequency index (FD) is emphasized in our analyses. The other parameter, image length (IL), although considered in the analysis, was used only as a complementary DNA damage parameter. Damage index (DI) thus was assigned to each comet according to

its class and ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells x 4) [39,40]. The damage frequency (%) was calculated as the number of cells with tails vs. those without. Results are presented as means and ranges of four independent experiments. The vehicle was used as negative control and H₂O₂ (100µM) was used as positive control.

2.6. Hipoxanthine/xanthine oxidase assay

An *in vitro* assay used to determine the antioxidant potential of β-carboline alkaloids was based on the method described by Owen et al. [41]. Briefly, alkaloids were dissolved in the assay buffer (1.0 ml - hypoxanthine, Fe(III), EDTA and salicylic acid) plus hexane (0.05-1%) and tested at 25-1500 µg/mL. In this assay hexane was used as solvent since DMSO showed pronounced antioxidative action. A 5 µL aliquot of xanthine oxidase dissolved in 3.2 M NH₂SO₄ was added to initiate the reaction. The sample tubes were incubated for 3 h at 37 °C, at which time the reaction was complete. A 30 µL aliquot of the reaction mixture was analyzed by HPLC using chromatographic conditions as described by Owen et al. [42,43]. Chromatographic analysis was done using a gradient based on methanol/water/acetic acid with a µBondaPak C18 reverse phase column (Waters) and detection at 325nm. The HPLC equipment had a 2695 separation module (Waters) and UV detector 2487 (Waters). The amount of dihydroxyphenol (2,5-dihydroxybenzoic acid and 2,3-dihydroxybenzoic acid) produced by the reaction of salicylic acid with produced hydroxyl radicals (OH•) was determined from standard curves of the respective dihydroxyphenols.

2.7. Statistics

Statistical analyses of the data were performed using Anova One-Way Tukey Multiple comparison Test. *P*-values less than 0.05 were considered to be significant. Data were expressed as means ± SD values.

3. Results

3.1. Sensitivity of *S. cerevisiae* to β -carbolinic alkaloids

Wild-type cells (WT) and isogenic mutant strains of *S. cerevisiae* lacking antioxidant defenses (table 1) were treated with several concentrations of the alkaloids for 1 h, during the stationary phase. All strains showed practically the same sensitivity for β -carboline alkaloids to that observed for the isogenic WT cells (data not shown). To verify the role of β -carboline alkaloids in cell oxidative stress, yeast cells were pre-treated with non-cytotoxic doses of harmane, harmine, harmol, harmaline, or harmalol and then further exposed to sub-lethal concentrations of either H₂O₂ or paraquat. A statistically significant survival was considered as an antioxidant effect of the alkaloids.

The aromatic β -carboline harmane significantly enhanced the survival of all yeast cells, with EG103 (WT) isogenic background at 50 and 100 μ g/mL after treatment with H₂O₂ (fig. 2A), showing a clear antioxidant protective effect. After treatment with paraquat, this effect was not very significant (fig. 3A). Although harmane did not protect the YPH98 WT to both oxidative agents, an important antioxidant effect was observed against H₂O₂ for *yap1*. Figure 2B shows that harmine at 50 μ g/mL had antioxidant activity against H₂O₂ for *sod1*, *sod2* and *ctt1* single mutants. This activity was more effective in the *sod1ctt1* double mutant. However, this alkaloid did not protect any yeast strain against the deleterious effects of paraquat (fig. 3B).

After treatment with H₂O₂, the harmol antioxidant activity was only observed for the strains deficient in both superoxide activity and the transcription factor *yap1* (fig. 2C). However, harmol protected EG103 WT as well as *sod1*, *ctt1* single and *sod1sod2*, *sod1ctt1* double mutants against treatment with paraquat (fig. 3C).

Harmaline (fig. 2D and 3D) showed a significant protection against paraquat and H₂O₂, mainly in the superoxide-lacking strains. Dihydro β -carboline harmalol demonstrated the strongest antioxidant effect (fig. 2E and 3E). This alkaloid significantly enhanced the survival of yeast cells at 50 and 100 μ g/mL for all EG103 (WT) isogenic strains in the pre-treatment assay, using H₂O₂ (fig. 2E) and paraquat (fig. 3E) as oxidants. Similar results were obtained for YPH98 (WT) and its isogenic strain lacking the Yap1p transcription factor (*yap1* Δ).

3.2. Antimutagenic effects in *S. cerevisiae*

Results of antimutagenicity tests in stationary yeast cells with N123 are shown in table 2. It is important to state, as previously demonstrated for harmine and harmine [8], that alkaloids alone did not induce any mutagenic effects at the tested doses and on this growth phase (data not shown). The oxidant agent H₂O₂ (4mM) was used to induce mutagenicity (positive control). All β-carboline alkaloids at low concentrations significantly reduced the mutagenic effects induced by H₂O₂. Dihydro β-carboline harmalol and harmaline were the most effective antimutagenic compounds; they reduced H₂O₂-induced mutagenicity to lower values.

3.3. Comet assay

Alkaloids alone did not significantly induce DNA damage (index and frequency) increase at the tested doses (data not shown). Table 3 shows the effects of all alkaloids on damage index and damage frequency, as measured by DNA damage in V79 cells, according to the SCG test, in the presence of H₂O₂. Harmine and harmine showed a significant decrease in the damage index and damage frequency only at lower concentrations, in relation to the genotoxicity induced by the oxidant H₂O₂. On the other hand, harmol, harmalol and harmaline clearly demonstrated a significant reduction in damage index and damage frequency at all concentrations used. The frequency of damage class was different for each alkaloid for each dose. The highest dose of the alkaloid (40 µg/mL for the aromatic and 80 µg/mL for de dihidro β- carbolines) tested in the absence of the oxidant agent did not induce a significant increase in DNA damage as compared to the negative control (table 3).

3.4. *In vitro* antioxidant capacity of β-carboline alkaloids

Figure 4 shows the results obtained by the xanthine oxidase *in vitro* antioxidant assay. All β-carboline alkaloids demonstrated a significant antioxidant capacity in a dose-dependent manner. Harmine, harmalol and harmaline had a more pronounced activity, reducing to 2.7%, 7.15% and 8.72%, respectively, the formation of both DHBA species in

the highest concentration used (1500 $\mu\text{g/mL}$), whereas harmol (38.2%) and harmine (42.2%) showed moderate activity in the reduction of DHBA.

4. Discussion

β -carboline alkaloids have shown a protective effect against the oxidative agents H_2O_2 and paraquat using yeast and mammalian cells as eukaryotic model organisms. The antioxidative effect observed for harmane, harmine, harmol, harmaline and harmalol clearly depends on the structure and concentration of the alkaloid.

In yeast survival tests, the EG103 isogenic strains *sod1 Δ* , *sod2 Δ* , *ctl1 Δ* , *sod1 Δ ctl1 Δ* , and *sod1 Δ sod2 Δ* , pre-treated with the alkaloids, showed a generally increased survival after exposure to hydrogen peroxide (fig. 2) and paraquat (fig. 3). The dihydro β -carboline alkaloids (harmalol and harmaline) had a higher protective potency than the aromatic β -carbolines (harmane, harmine and harmol). The antioxidant effect was more pronounced for H_2O_2 , which may suggest that the alkaloids are acting as scavengers of hydroxyl radicals (OH^\bullet), generated through the Haber-Weiss/Fenton reaction [44]. It is important to take into account that the superoxide anion (generated by paraquat treatment) is known to oxidize exposed (4Fe-4S) clusters in certain enzymes, leading to inactivation of the enzyme and liberation of iron [45,46,47], which thus becomes available to participate in the Fenton reaction, and consequently yields OH^\bullet radicals.

It is also important to note the antioxidant response observed in the *yap1* mutants for most alkaloid treatments, especially for the dihydro β -carbolines (fig. 2D 2E, 3D and 3E). Yap1 is key regulator of oxidative stress tolerance in *S. cerevisiae* and has been shown to regulate a broad set of genes in response to oxidative stress. Consequently, *yap1 Δ* mutants are very sensitive to oxidative stress [48,49]. Hence, only potent antioxidants are able to protect this strain in this model. Our results thus demonstrate a direct action of the alkaloids as ROS scavenger, rather than an induction of other antioxidant defenses that would lead to an adaptive response in yeast.

The capacity of β -carbolines to scavenge OH^\bullet radicals was confirmed in the results of the *in vitro* hypoxanthine/xantine oxidase assay (fig. 4), through the detection of dihydroxybenzoic acids (DHBA) produced by OH^\bullet radical action on salicylic acid [41].

Indeed, Lee et al. (2000) have shown that β -carbolines (harmalol, harmaline and harmine) caused the decomposition of hydroxyl radicals, assayed by inhibition of 2-deoxy-D-ribose degradation, and that the dihydro- β -carbolines harmalol and harmaline have the most effective activity. However, the same authors also demonstrated that these alkaloids are not active against superoxide anions, when tested using SOD-inhibitable reduction of ferricytochrome c.

ROS-induced DNA damage may cause mutations resulting in neurodegenerative disease, cancer and ageing [50,51,52]. Oxidative lesions in DNA include base modifications, sugar damage, strand breaks, and abasic sites. H_2O_2 causes strand breaks and base damage in DNA by a mechanism that requires transition metal ions [53,54]. Metals, such as copper and iron, which are present in biological systems, react with H_2O_2 via Fenton reactions to produce hydroxyl radicals (OH^\bullet) and then induce DNA strand breakage [55]. OH^\bullet is extremely short-lived and reacts rapidly with almost any cellular biomolecule, including DNA [56]. The β -carboline alkaloids showed strong activity against H_2O_2 -induced oxidative damage on DNA, in the anti-mutagenic assay using strain N123 of *S. cerevisiae* and in the anti-genotoxic assay using mammalian V79 cells. The dihydro- β -carbolines, once more, showed a more pronounced effect than aromatic β -carbolines. It may therefore be suggested that the activities reported here probably result from a structure-dependent scavenger action of the alkaloids against ROS, especially OH^\bullet radicals, in the following decreasing order: harmalol > harmaline > harmol > harmane > harmine.

Indole precursors of the β -carbolines, tryptophan and tryptamines, are known to have antioxidative activities, possibly by scavenging reactive oxygen radicals and forming a stable indole radical at the pyrrole ring [57,58,59]. Tse et al. [9] suggest that the indole nucleus of the β -carbolines can have similar antioxidant properties. This could explain the strong *in vitro* antioxidant activity observed by harmane (in the xanthine oxidase assay), which does not possess a ring substitution. However, since this alkaloid can intercalate in DNA [24,25,60,61], this could also be responsible for the reduced antioxidant activity observed in yeast cells, as well as for the reduced anti-mutagenic and anti-genotoxic activities in our experiments.

In agreement with these results, and in agreement with what was described by Tse et al. [9], it is possible to affirm that β -carboline alkaloids have antioxidative actions, and

their capacity is dependent on chemical structure. Dehydrogenation of the pyridyl ring (e.g. harmalol to harmol; harmaline to harmine) resulted in a large decrease in antioxidant efficacies. The substitution of the hydroxyl group for a methoxyl group also decreases the antioxidant effect (e.g. harmalol to harmaline; harmol to harmine). Of all β -carbolines studied, harmalol was found to have the highest scavenger action.

In summary, our findings indicate that the β -carboline alkaloids have a significant antioxidative effect in yeast and that their hydroxyl radical scavenging property appears to contribute to their anti-mutagenic and anti-genotoxic effects, observed in yeast and mammalian cells, respectively.

Acknowledgments

We thank Dr. Cristine Gaylard for the english review and Dr. Jaqueline Nascimento Picada for critical reading the manuscript. Research supported by grants from the Brazilian Agencies *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), *Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul* (FAPERGS) and GENOTOX—Laboratory of Genotoxicity, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

References

- [1] J.R.F. Allen, B.R. Holmsted. The simple β -carboline alkaloids. *Phytochemistry* 19 (1980) 1573-1582.
- [2] J. Adachi, Y. Mizoi, T. Naito, K. Yamamota, S. Fujiwara, I. Ninomiya. Determination of β -carboline in foodstuffs by high-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 538 (1991) 331-339.
- [3] G.A. Gross, L.B. Turesky, L.B. Fay, W.G. Stillwell, P.L. Skipper, S.R. Tannenbaum. Heterocyclic aromatic amine formation in grilled bacon, beef and fish and rill scrapings. *Carcinogenesis* 14 (1993) 2313-2318.

- [4] J.C. Callaway, L.P. Raymon, W.L. Hearn, D.J. McKenna, C.S. Grob, G.S. Brito, D.C. Mash. Quantification of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. *J. Anal. Toxicol.* 20 (1996) 492-497.
- [5] Y.H. Totsuka, H. Ushiyama, J. Ishihara, R. Sinha, S. Goto, T. Sugimura, K. Wakabayashi. Quantification of the co-mutagenic beta-carboline, norharman and harman, in cigarette smoke condensates and cooked foods. *Cancer Lett.* 143 (1999) 139-143.
- [6] W. Zheng, S. Wang, L.F. Barnes, Y. Guan, E.D. Louis. Determination of harmane and harmine in human blood using reverse-phase high performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Anal. Biochem.* 279 (2000) 125-129.
- [7] C.S. Freedland, R.S. Mansbach. Behavioral profile of constituents in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant mixture. *Drug Alcohol Depend.* 54 (1999) 183-194.
- [8] J.M. Boeira, A.F. Viana, J.N. Picada, J.A.P. Henriques. Genotoxic and recombinogenic activities of the two beta-carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 500 (2002) 39-48.
- [9] S.Y.H. Tse, I.T. Mak, B.F. Dickens. Antioxidative properties of harmane and β -carboline alkaloids. *Biochem. Pharmacol.* 42 (1991) 459-464.
- [10] H. Rommelspacher, T. May, B. Salewski. Harman (1-methyl-beta-carboline) is a natural inhibitor of monoamine oxidase type A in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 252 (1994) 51-59.
- [11] H. Kim, S.O. Sablin, R.R. Ramsay. Inhibition of monoamine oxidase A by β -carboline derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* 337 (1997) 137-142.
- [12] T. Herraiz, C. Chaparro. Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: β -carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326 (2005) 378-386.
- [13] G. Pimpinella, M. Palmery. Interaction of β -carbolines with central dopaminergic transmission in mice: structure-activity relationships. *Neurosci. Lett.* 189 (1995) 121-124.

- [14] B. Grella, M. Dukat, R. Young, M. Teitler, K.H. Davis, C.B. Gauthier, R.A. Glennon. Investigation of hallucinogenic and related β -carbolines. *Drug Alcohol Depend.* 50 (1998) 99-107.
- [15] R. A. Glennon, M. Dukat, B. Grella, S.S. Hong, L. Costantino, M. Teitler, C. Smith, C. Egan, K. Davis, M.V. Mattson. Binding of β -carbolines and relating agents at serotonin (5-HT₂ and 5-HT_{1A}), dopamine (D₂) and benzodiazepines receptors, *Drug Alcohol Depend.* 60 (2000) 121-132.
- [16] S.M. Husbands, R.A. Glennon, S. Gorgerat, R. Gough, R. Tyacke, D.J. Nutt, J.W., Lewis, A.L. Hudson. β -carboline binding to imidazole receptors. *Drug Alcohol Depend.* 64 (2001) 203-208.
- [17] E.P. Squires, C.E. Hills, G.J. Rogers, P. Garland, S.R. Farley, N.G. Morgan. The putative imidazoline receptor agonist, harmaline, promotes intracellular calcium mobilization in pancreatic β -cells. *Eur. J. Pharmacol.* 501 (2004) 31-39.
- [18] G.H. Loew, J. Nienow, J.A. Lawson, L. Toll, E.T. Uyeno. Theoretical structure-activity studies of β -carbolines analogs. Requirements of benzodiazepine receptor affinity and antagonist activity. *Mol. Pharmacol.* 28 (1985) 17-31.
- [19] M.L. Barbaccia, L. Ravizza, E. Costa. Maprotiline: an antidepressant with an unusual pharmacology profile. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 236 (1986) 307-312.
- [20] R.W. Fuller, C.J. Wong, S.K. Hemrick-Luecke. MD240928 and harmaline: opposite selectivity in antagonism of the inactivation of types A and B monoamine oxidase by paralyline in mice. *Life Sci.* 38 (1986) 409-412.
- [21] Z. Taira, S. Kansawas, C. Dohara, S. Ishida, M. Matsumoto, M. Ohsawa. Intercalation of six β -carboline derivatives into DNA. *Jap. J. Toxicol. Environ. Health* 43 (1997) 83-91.
- [22] M. Balon, M.A. Munoz, C. Carmona, P. Guardado, M. Galan. A fluorescent study of the molecular interactions of harmaline with the nucleobases, their nucleosides and mononucleotides. *Biophys. Chem.* 80 (1999) 41-52.

- [23] Y. Funayama, K. Nishio, K. Wakabayashi, M. Nagao, K. Shimoi, T. Ohira, S. Hasegawa, N. Saijo. Effects of β - and γ -carboline derivatives on DNA topoisomerase activities. *Mutat. Res.* 349 (1996) 183-191.
- [24] J.N. Picada, K.V.C.L. Silva, B. Erdtmann, A.T. Henriques, J.A.P. Henriques. Genotoxic effects of structurally related β -carboline alkaloids. *Mutat. Res.* 379 (1997) 135-149.
- [25] J.M. Boeira, J. Silva, B. Erdtmann, J.A.P. Henriques. Genotoxic effects of the alkaloids Harman and Harmine by Comet assay and chromosome aberration test in mammalian cells in vitro. *Pharmacol. Toxicol.* 89 (2001) 287-294.
- [26] I.S. Cho, Y.K. Shin, C.S. Lee. Effects of harmaline and harmalol on the oxidative injuries of hyaluronic acid, lipid and collagen by Fe^{2+} and H_2O_2 . *Korean J. Pharmacol.* 31 (1995) 345-353.
- [27] H.H. Kim, Y.Y. Jang, E.S. Han, C.S. Lee. Differential antioxidant effects of ambroxol, rutin, glutathione and harmaline. *J. Appl. Pharmacol.* 7 (1999) 112-120.
- [28] C.S. Lee, E.S. Han, Y.Y. Jang, J.H. Han, H.W. Há, D.E. Kim. Protective effect of harmalol and harmaline on MPTP neurotoxicity in the mouse and dopamine-induced damage of brain mitochondria and PC12 cell. *J. Neurochem.* 75 (2000) 521-531.
- [29] D.H. Kim, Y.Y. Jang, E.S. Han, C.S. Lee. Protective effect of harmaline and harmalol against dopamine and 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage of brain mitochondria and synaptosomes, and viability loss of PC12 cells. *Eur. J. Neurosci.* 13 (2001) 1861-1872.
- [30] T.H. Park, O.S. Kwon, S.Y. Park, E.S. Han, C.S. Lee. N-methylated β -carbolines protect PC12 cells from cytotoxic effects of MPP^+ by attenuation of mitochondrial membrane permeability change. *Neurosci. Res.* 46 (2003) 349-358.
- [31] H. Wiseman, B. Halliwell. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* 313 (1996) 17-29.

- [32] E.R. Stadtman, B.S. Berlett. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem. Res. Toxicol.* 10 (1997) 485-494.
- [33] M.A. Smith, C.A. Rottkamp, A. Nunomura, A.K. Raina, G. Perry. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1502 (2000) 139-134.
- [34] V.D. Longo, E.B. Gralla, J.S. Valentine. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 12275-12280.
- [35] L. Cyrne, L. Martins, L. Fernandes, H.S. Marinho. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. *Free Radic. Biol. Med.* 34 (2003) 385-393.
- [36] G. Speit, B. Habermeier, R. Helbig. Differences in the responses to mutagens between two V79 sublines. *Mutat. Res.* 325 (1994) 105-111.
- [37] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cell. *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184-191.
- [38] A. Hartmann, G. Speit. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol. Lett.* 90 (1997) 183-188.
- [39] A.R. Collins. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 26 (2004) 249-261.
- [40] J. Silva, T.R. Freitas, V. Heuser, J.R. Marinho, B. Erdtmann. Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by assay and micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 270-278.
- [41] R.W. Owen, T. Wimonwatwatee, B. Spiegelhalder, H. Bartsch. A high performance liquid chromatography method for quantification of hydroxyl radical formation by determination of dihydroxy benzoic acids. *Eur. J. Cancer Prev.* 5 (1996) 233-240.

- [42] R.W. Owen, A. Giacosa, W.E. Hull, R. Haubner, B. Spiegelhalder, H. Bartsch. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur. J. Cancer* 36 (2000) 1235-1247.
- [43] R.W. Owen, R. Haubner, W. Mier, A. Giacosa, W.E. Hull, B. Spiegelhalder, H. Bartsch. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food Chem. Toxicol.* 41 (2003) 703-717.
- [44] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3^a ed. Oxford University Press, New York, 2000.
- [45] S.I. Liochev, I. Fridovich. The role of O^{2-} in the production of $HO\cdot$: in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 16 (1994) 29-33.
- [46] K. Murakami, M. Yoshino. Inactivation of aconitase in yeast exposed to oxidative stress. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 41 (1997) 481-486.
- [47] J.M. Freitas, A. Liba, R. Meneghini, J.S. Valentine, E.B. Gralla, Yeast lacking Cu-Zn superoxide dismutase show altered iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* 275 (1999) 11645-11649.
- [48] S.T. Coleman, E.A. Epping, S.M. Steggerda, S.M. Rowley. Yap1p activates gene transcription in an oxidant-specific fashion. *Mol. Cell Biol.* 19 (1999) 8302-8313.
- [49] J.N. Picada, A.F. Maris, K. Ckless, M. Salvador, N.N. Khromov-Borisov, J.A.P. Henriques. Differential mutagenic, antimutagenic and cytotoxic responses induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in bacteria and yeast. *Mutat. Res.* 539 (2003) 29-41.
- [50] B.N. Ames, L.S. Gold. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat. Res.* 250 (1991) 13-16.
- [51] P. K. Singal, N. Khaper, V. Palace, D. Kumar. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovasc. Res.* 40 (1998) 426-432.

- [52] M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C.J. Rhodes, J. Telser. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell Biochem.* 266 (2004) 37-56.
- [53] M. Dizdaroglu. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic. Biol. Med.* 10 (1991) 225-242.
- [54] D.H. Lee, T.R. O'Connor, G.P. Pfeifer. Oxidative DNA damage induced by copper and hydrogen peroxide promotes CG-TT tandem mutations at methylated CpG dinucleotides in nucleotide excision repair-deficient cells. *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 3566-3573.
- [55] I. Fridovich. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* 201 (1998) 1203-1209.
- [56] C. Zhao, G. Dodin, C. Yuan, H. Chen, R. Zheng, Z. Jia, B.T. Fan. In vitro protection of DNA from Fenton reaction by plant polyphenol verbascoside. *Biochim. Biophys. Acta* 1723 (2005) 114-123.
- [57] T. Uemura, M. Kanashiro, K. Hirai, N. Miyazaki. Isolation structure and properties of the β -carboline alkaloids formed from 5-hydroxytryptamine by the superoxide anion-generating systems. *J. Neurochem.* 51 (1988) 710-717.
- [58] M.R. DeFelippis, C.P. Murthy, M. Faraggi, M.H. Klapper. Pulse radiolytic measurement of redox potential: The tyrosine and tryptophan radical. *Biochemistry* 28 (1989) 4847-4853.
- [59] S. Christen, E. Peterhans, R. Stocker. Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: Possible implication for inflammatory disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 2506-2510.
- [60] K. Hayashi, M. Nagao, T. Sugimura. Interaction of norharman and harman with DNA. *Nucleic Acids Res.* 4 (1977) 3679-3685.
- [61] G. Duportail, H. Lami. Studies of the interaction of the fluorophores harmine and harmaline with calf thymus DNA. *Biochim. Biophys. Acta* 402 (1975) 20-30.

Table 1. *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study.

Strain	Genotype	Source
EG103 (SOD-WT)	<i>MATα leu2-3 112his3-Δ1 trp1-289 ura3-52</i>	E. Gralla
EG118 (<i>sod1Δ</i>)	like EG103, except <i>sod1::URA3</i>	E. Gralla
EG110 (<i>sod2Δ</i>)	like EG103, except <i>sod2::TRP1</i>	E. Gralla
EG133 (<i>sod1Δ sod2Δ</i>)	like EG103, except <i>sod1::URA3</i> e <i>sod2::TRP1</i>	E. Gralla
EG223 (<i>ctt1Δ</i>)	like EG103, except <i>ctt1::TRP1</i>	E. Gralla
EG (<i>sod1Δ ctt1Δ</i>)	like EG103, except <i>sod1::URA3</i> e <i>ctt1::TRP1</i>	E. Gralla
YPH98 (WT)	<i>MATα ade2-101 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52</i>	P. Hieter
<i>yap1Δ</i>	like YPH98 except <i>yap1::URA3</i>	M. Grey
N123	<i>MATα his1-7</i>	J.Henriques

Table 2. Effects of β -carbolinic alkaloids on induced mutagenicity by hydrogen peroxide (H_2O_2) in haploid N123 strain of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase in PBS.

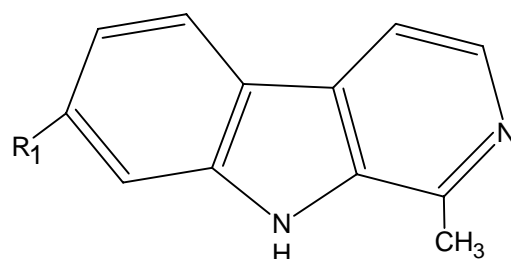
Agent	Treatment	Survival (%)	Can/ 10^7 survivors ^a
NC ^b	0	100 (247) ^d	1.02 ± 0.12^e
$H_2O_2^c$	4 mM	42.10 (104)	19.29 ± 2.08
Harmane	10 μ g/mL + H_2O_2	74.89 (185)	$5.67 \pm 0.80^{***}$
	25 μ g/mL + H_2O_2	69.73 (172)	$6.99 \pm 0.10^{**}$
	50 μ g/mL + H_2O_2	67.20 (166)	$9.64 \pm 1.81^{**}$
Harmine	10 μ g/mL + H_2O_2	70.85 (175)	$5.95 \pm 0.38^{***}$
	25 μ g/mL + H_2O_2	60.42 (147)	$7.49 \pm 1.11^{**}$
	50 μ g/mL + H_2O_2	55.46 (120)	$13.5 \pm 1.57^*$
Harmol	10 μ g/mL + H_2O_2	79.77 (185)	$4.46 \pm 0.57^{***}$
	25 μ g/mL + H_2O_2	72.82 (169)	$3.58 \pm 1.25^{***}$
	50 μ g/mL + H_2O_2	61.34 (142)	$10.92 \pm 2.26^*$
Harmaline	10 μ g/mL + H_2O_2	67.26 (136)	$6.68 \pm 1.66^{**}$
	25 μ g/mL + H_2O_2	65.47 (146)	$4.44 \pm 0.22^{***}$
	50 μ g/mL + H_2O_2	73.99 (178)	$7.59 \pm 3.15^{**}$
Harmalol	10 μ g/mL + H_2O_2	68.70 (145)	$8.88 \pm 1.30^{**}$
	25 μ g/mL + H_2O_2	74.89 (185)	$4.38 \pm 0.32^{***}$
	50 μ g/mL + H_2O_2	71.25 (176)	$1.98 \pm 0.19^{***}$

^a Locus-specific revertants; ^b Negative Control (solvent – DMSO 5%); ^c Positive control; ^d Number of colonies; ^e Mean and standard deviation per three independent experiments; * Data significant in relation to positive control group at $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ / One-way ANOVA Tukey's Multiple Comparison Test.

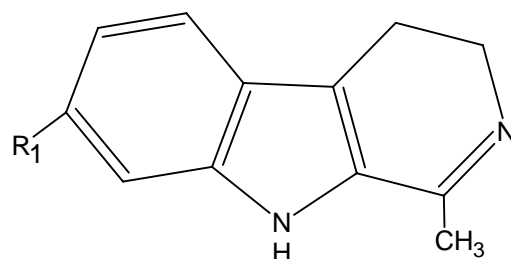
Table 3. Effect of β -carboline alkaloids in V79 cells exposed for 2 hours plus oxidant H_2O_2 for 0.5 h and evaluated by Comet Assay.

Substance	Treatment	Damage Index ^c	Damage Frequency (%) ^c
NC ^a	0	46.35 \pm 4.83	22.45 \pm 6.11
H_2O_2 ^b	0.1 mM	219.66 \pm 36.08	86.36 \pm 6.35
Harmane	10 μ g/mL + H_2O_2	92.33 \pm 13.79***	41.33 \pm 3.05***
	20 μ g/mL + H_2O_2	122.00 \pm 6.00***	58.00 \pm 3.00**
	40 μ g/mL + H_2O_2	173.33 \pm 18.7	68.66 \pm 1.52
	40 μ g/mL	102.71 \pm 6.19 [#]	69.66 \pm 1.57 [#]
Harmine	10 μ g/mL + H_2O_2	106.00 \pm 21.96***	55.66 \pm 6.42**
	20 μ g/mL + H_2O_2	123.33 \pm 24.58*	67.33 \pm 2.30
	40 μ g/mL + H_2O_2	215.66 \pm 6.42	84.66 \pm 7.50
	40 μ g/mL	103.2 \pm 4.58 [#]	71.64 \pm 1.82 [#]
Harmol	10 μ g/mL + H_2O_2	92.66 \pm 11.60***	44.33 \pm 2.51***
	20 μ g/mL + H_2O_2	108.66 \pm 19.03***	56.33 \pm 2.00**
	40 μ g/mL + H_2O_2	128.33 \pm 41.01**	64.66 \pm 9.50*
	40 μ g/mL	93.33 \pm 7.57 [#]	58.30 \pm 14.97
Harmaline	10 μ g/mL + H_2O_2	106.33 \pm 11.93***	60.00 \pm 7.80***
	20 μ g/mL + H_2O_2	107.66 \pm 7.57***	50.33 \pm 15.71***
	40 μ g/mL + H_2O_2	106.00 \pm 1.73***	54.33 \pm 4.61***
	80 μ g/mL + H_2O_2	116.66 \pm 13.57***	52.33 \pm 1.15***
	80 μ g/mL	79.00 \pm 13.51	52.62 \pm 4.72
Harmalol	10 μ g/mL + H_2O_2	86.33 \pm 12.85***	50.00 \pm 11.36***
	20 μ g/mL + H_2O_2	112.33 \pm 8.38***	49.66 \pm 4.93***
	40 μ g/mL + H_2O_2	115.33 \pm 17.00***	54.66 \pm 3.51***
	80 μ g/mL + H_2O_2	95.00 \pm 14.73***	48.33 \pm 10.06***
	80 μ g/mL	62.33 \pm 15.53	48.66 \pm 10.96

^a Negative control (solvent- DMSO 5%); ^b positive control (H_2O_2); ^c mean values and standard deviation obtained from average of 100 cells per experiment – total of three experiments for each substance; * data significant in relation to positive control (oxidant) group at $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ / One-way ANOVA Tukey's Multiple Comparison Test.

A Series Aromatic β -carbolines

- R = H Harmane (1-methyl -9H-Pyrido [3,4-b] indole)
- R = OCH₃ Harmine (7-methoxy- 1-methyl -9H-Pyrido [3,4-b] indole)
- R = OH Harmol (7-ol- 1-methyl 9H-Pyrido [3,4-b] indol)

B Series Dihydro- β -carbolines

- R = OCH₃ Harmaline (7-methoxy-1-methyl-3H-Pyrido[3,4-b]indole, 4,9-dihydro)
- R = OH Harmalol (7-ol-1-methyl-3H-Pyrido[3,4-b]indole, 4,9-dihydro)

Figure 1. Chemical structure of the β -carboline alkaloids. A; aromatic β -carboline. B: dihydro- β -carbolines.

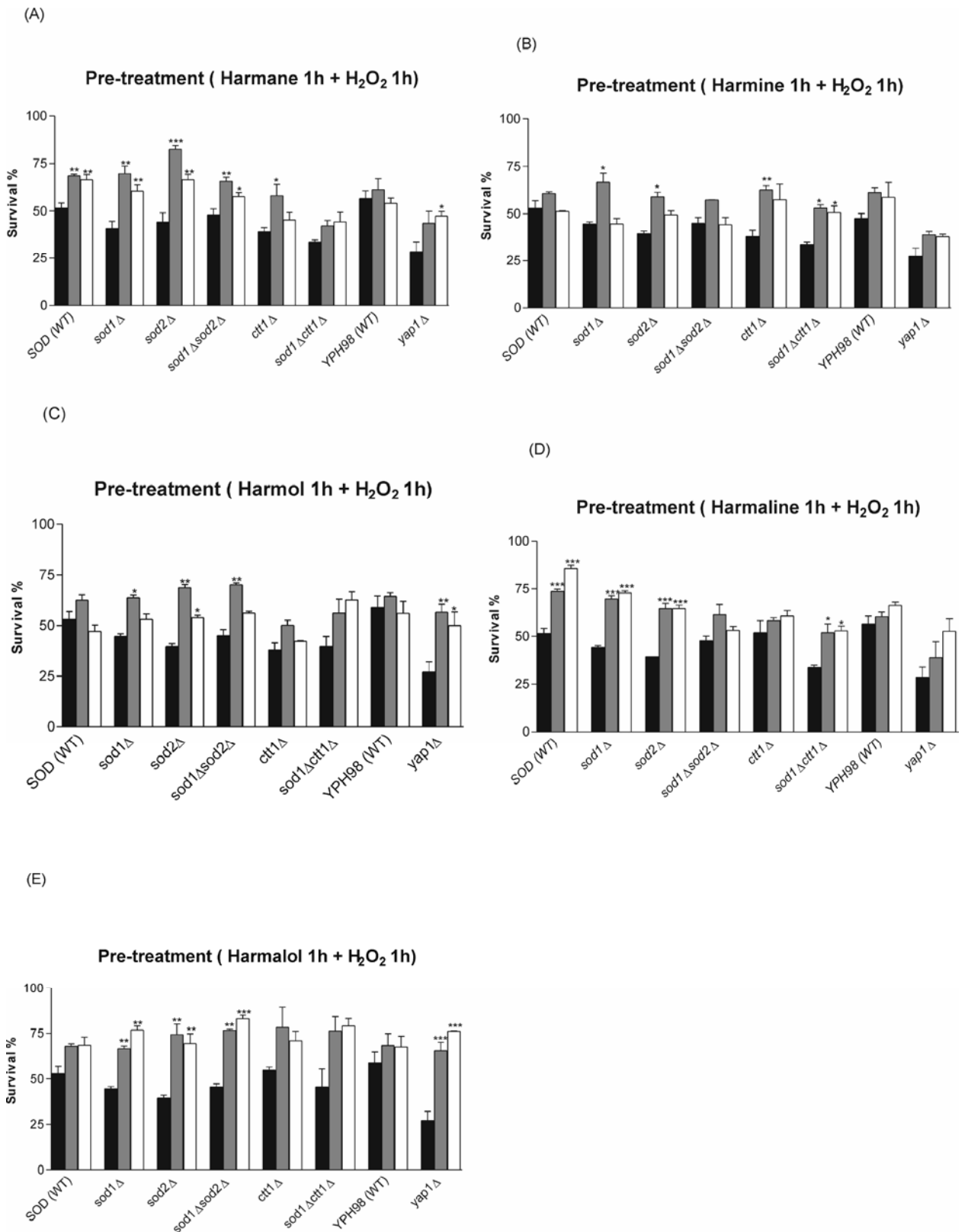


Figure 2. Effect of pre-treatments with β -carbolines on survival after treatment with oxidant H₂O₂ in EG103 (WT) and mutant isogenic strains and YPH98 (WT) and mutant isogenic strains. Fig. 1A (■) H₂O₂ (5mM); (▣) 50μg/mL harmane + H₂O₂ (5mM); (□)

100µg/mL harmane + H₂O₂ (5mM). Fig. 1B (■) H₂O₂ (5mM); (□) 50µg/mL harmine + H₂O₂ (5mM); (□) 100µg/mL harmine + H₂O₂ (5mM). Fig. 1C (■) H₂O₂ (5mM); (□) 50µg/mL harmol + H₂O₂ (5mM); (□) 100µg/mL harmol + H₂O₂ (5mM). Fig. 1D (■) H₂O₂ (5mM); (□) 50µg/mL harmaline + H₂O₂ (5mM); (□) 100µg/mL harmaline + H₂O₂ (5mM). Fig. 1E (■) H₂O₂ (5mM); (□) 50µg/mL harmalol + H₂O₂ (5mM); (□) 100µg/mL harmalol + H₂O₂ (5mM). Percentage survival is expressed relative to the untreated control culture (100%). Values shown are the mean at least three determinations. *Data significant in relation to oxidant-treated samples at $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ //One-way ANOVA Tukey's Multiple Comparison Test.

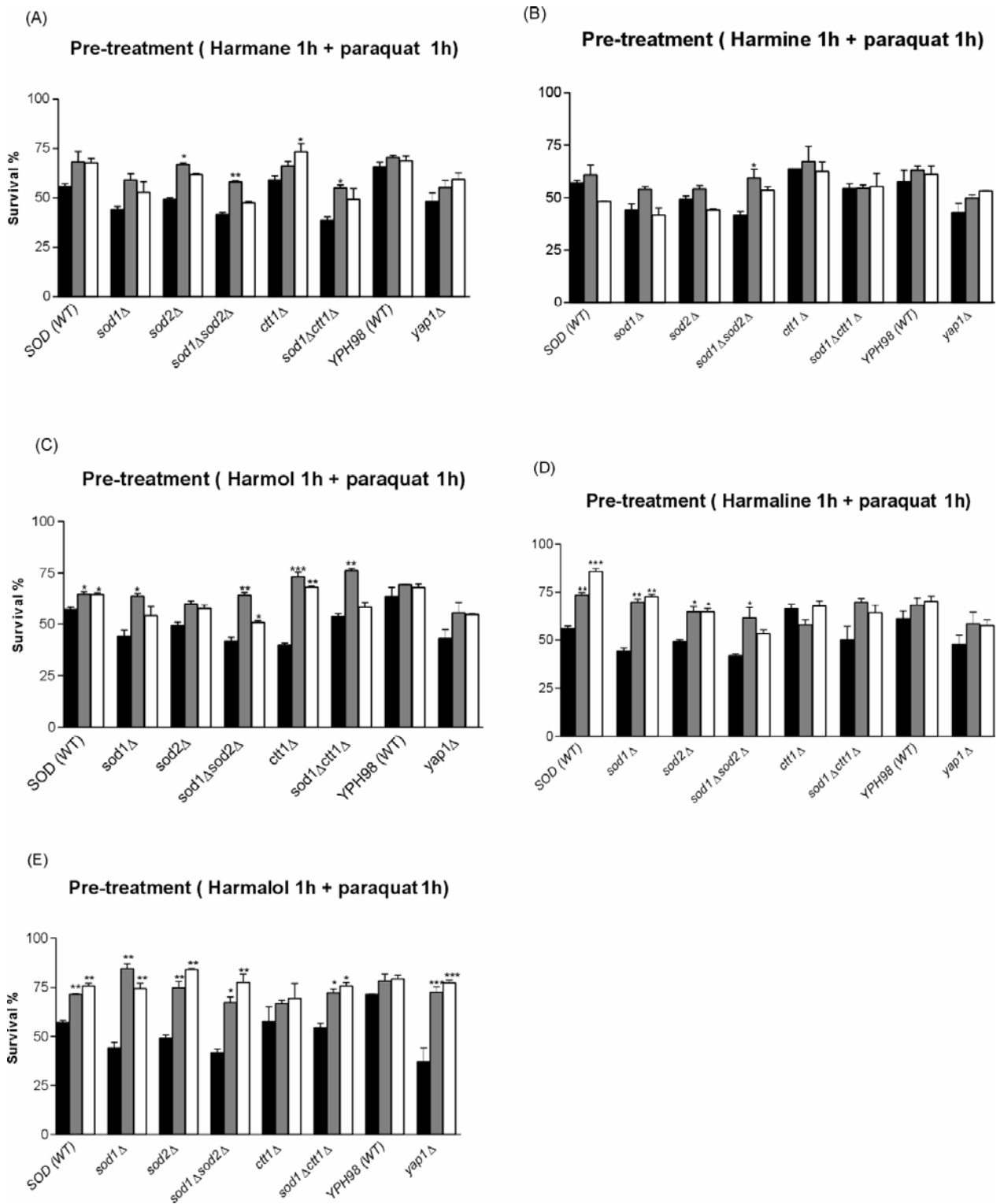


Figure 3. Effect of pre-treatments with β -carbolines on survival after treatment with oxidant paraquat in EG103 and mutant isogenic strains and YPH98 (WT) and mutant isogenic strains. Fig. 1A (■) paraquat (5mM); (□) 50 μ g/mL harmano + paraquat (5mM); (□) 100 μ g/mL harmano + paraquat (5mM). Fig. 1B (■) paraquat (5mM); (□) 50 μ g/mL

harmine + paraquat (5mM); (□) 100µg/mL harmine + paraquat (5mM). Fig. 1C (■) paraquat (5mM); (□) 50µg/mL harmol + paraquat (5mM); (□) 100µg/mL harmol + paraquat (5mM). Fig. 1D (■) paraquat (5mM); (□) 50µg/mL harmaline + paraquat (5mM); (□) 100µg/mL harmaline + paraquat (5mM). Fig. 1E (■) paraquat (5mM); (□) 50µg/mL harmalol + paraquat (5mM); (□) 100µg/mL harmalol + paraquat (5mM). Percentage survival is expressed relative to untreated control culture (100%). Values shown are the mean at least three determinations. *Data significant in relation to oxidant-treated samples at $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ /One-way ANOVA Tukey's Multiple Comparison Test.

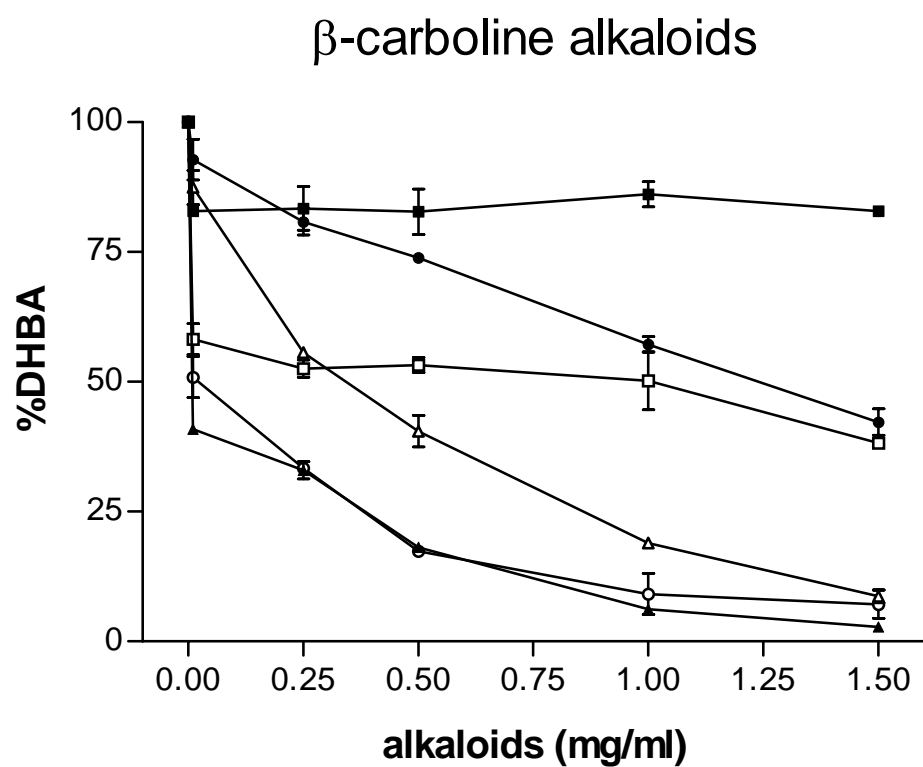


Figure 4. Inhibition of the generation of reactive oxygen species by β -carboline alkaloids in hypoxanthine/xanthine oxidase systems. (■) solvent (hexane); (▲) harmane; (●) harmine; (□) harmol; (○) harmalol; and (Δ) harmaline.

CAPÍTULO II

**Effects of β -carboline alkaloids
on the object recognition task in mice**

(Submetido a Life Sciences)

Effects of β -carboline alkaloids on the object recognition task in mice

Dinara Jaqueline Moura^{1&}, Camile Rorig^{2&}, Daiane Loss Vieira², João Antonio Pêgas Henriques¹, Rafael Roesler³, Jenifer Saffi^{1,4}, Jane Marlei Boeira^{2*}

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

² Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim, RS, Brasil

³ Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

⁴ Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil

Corresponding author. Departamento de Ciências da Saúde, URI, Avenida Sete de Setembro 1621, Caixa Postal 743, CEP 99700-000, Erechim, RS, Brasil. Tel.: +55 54 5209000 Ramal 9073; fax: +55 54 5209090.

E-mail address: jmboeira@yahoo.com.br (J. Boeira)

& These authors contributed equally to this work.

Abstract

β -carboline alkaloids are found in several medicinal plants and display a variety of actions on the central nervous, muscular and cardiovascular systems. The aim of the present study was to evaluate the effects of systemic administration of β -carboline alkaloids on object recognition memory in mice. Adult Swiss mice received an intraperitoneal injection (i.p.) of alkaloids (1.0, 2.5 or 5.0mg/kg) 30 min before training in an object recognition task. The fully aromatic β -carbolines, harmine and harmol, induced an enhancement of short-term memory (STM) at all doses tested when compared to controls. Harmaline, a dihydro β -carboline and inverse agonist of the MK-801 binding site on the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, also induced an enhancement of both short-term memory (STM and long-term memory (LTM)). These results demonstrate that systemic administration of β -carboline alkaloids can improve object recognition memory in mice.

Keywords: Beta-carboline alkaloids; Object recognition; Memory

1. Introduction

β -carbolines are a class of alkaloids that have elicited considerable research interest (Pfau and Skog, 2004). They consist of an indole nucleus and a pyridine ring. They can be divided into three structural groups, depending upon their degree of ring saturation: (a) the fully aromatic harmaline derivatives; i.e. those with a fully unsaturated pyridine ring; (b) the dihydro or harmaline derivatives, and (c) the tetrahydro derivatives (Glennon et al., 2000).

These compounds, also known as harmala alkaloids, have been identified in plants that have a long tradition in ethnopharmacology and are active constituents of hallucinogenic plants used in South American Indian cultures (Freedland and Mansbach, 1999). However, harmala alkaloids are also said to occur endogenously in normal body constituents, such as blood plasma, heart, kidney, liver and brain tissue (May et al., 1994). Following intensive psychopharmacologic investigations, a wide range of central nervous system (CNS) receptors, to which β -carbolines bind with high affinity, were identified (Rommelspacher et al., 1994; Pimpinella and Palmery, 1995; Glennon et al., 2000; Squires et al., 2004). These include receptors in the brain, such as 5-hydroxytryptamine-receptor subtypes (5-HT₂, 5-HT_{1A}) (Glennon et al., 2000), and imidazoline receptors (Squires et al., 2004), which inhibit enzymes such as monoamine oxidase-A (Kim et al., 1997; Herraiz and Chaparro, 2005) and influence cerebral neurotransmitters (Squires et al., 2004). In addition, the β -carboline alkaloids also act on dopaminergic transmission (Pimpinella and Palmery, 1995) and interact at the glutamate receptor of the type *N-methyl-D-aspartate* (NMDA) (Du et al., 1997).

The biological significance of β -carbolines have been suggested to have cytotoxic as well as neuroprotective properties. Since they are structurally similar to *1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine* (MTPT) (Albores et al., 1990), which induces a parkinsonian-like syndrome in animals, they have been postulated to act as endogenous neurotoxins. However, β -carbolines protect neurons against the excitotoxic effects of dopamine and glutamate (Maher and Davis, 1996), and display a protective effect on oxidative neuronal damage through a scavenging action on reactive oxygen species (Lee et al., 2000; Kim et al., 2001; Park et al., 2003). Recently, two β -carboline alkaloids, harmaline and harmane, have been shown to lower voltage-gated calcium channel currents (Spletstoeser et al., 2005), resulting in reduced neuron excitation. On the other hand,

harmaline is known to produce dysfunctions such as motor tremor (Lamarre and Mercier, 1971; Lamarre and Puil, 1974), alteration in associative and motor learning (Welsh, 1998) and calcium channel opening, with a resultant increase in neuronal excitability (Du et al., 1997). Harmaline also induces a shift in emotional reactivity, particularly in anxiety displaying anxiogenic and anxiolytic actions (Hilber and Chapillon, 2005).

Toxic and mutagenic effects of these alkaloids have been reported in prokaryotic (Oda et al., 1988; Picada et al., 1997) and eukaryotic cells (Madle et al., 1981; Thoda et al., 1983; Boeira et al., 2001, 2002). It is thus important to further evaluate the potential beneficial or toxic effects of these compounds, using behavioral endpoints of neural function.

The novel object recognition task in rodents (Ennaceur and Delacour, 1998) has been shown to be a very useful experimental tool for assessing changes in neuronal function induced by drugs or genetic modifications (Puma et al., 1999; Tang et al., 1999; Rampon et al., 2000; Schröder et al., 2005). Novel object recognition is a type of non aversive, non spatial memory that requires glutamate 3-methyl-D-aspartate receptor (NMDAr) activation in the hippocampus (Tang et al., 1999; Rampon et al., 2000; de Lima et al., 2005a). Since some β -carbolines affect some parameters of glutamatergic transmission and the β -carbolines have a number of actions that may affect widespread regions of the nervous systems, we undertook the present study to investigate the effect of systemic administration of harmane, harmine and harmol (fully aromatic) and harmaline (dihydro- β -carboline) alkaloids on object recognition memory in mice.

2. Materials and methods

2.1 Animals

One hundred and sixty male adult Swiss albino mice (3 months old) were obtained from the Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI, Erechim-RS, Brazil). Different animals were used in short- and long-term memory retention tests and ten mice were used for each alkaloid dose, including the control group (vehicle). Animals were housed five to a cage with food and water available *ad libitum*, and were maintained under standard conditions of temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) humidity ($55 \pm 5\%$) and illumination (12 h light/dark cycle). Behavioral procedures were conducted between 9:00

and 17:00h. All experiments were performed according to the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication N° 85-23 revised 1996) and approved by CONEP – Brazil (National Commission of Research Ethics, Protocol 090-1/PIA/04).

2.2. Drugs and pharmacological procedures

The alkaloids harmine (CAS 21655-84-5), harmine (CAS 343-27-1; approximately 98% purity), harmol (CAS 149022-16-2) and harmaline (CAS 6027-98-1; approximately 98% purity) hydrochloride were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). For the treatment of mice, 5mg/mL stock solutions of both alkaloids were prepared immediately prior to use. Harmine was dissolved in saline (NaCl 0.9%) and the other three alkaloids tested were dissolved in saline with 5% dimethylsulfoxide (DMSO). For the object recognition task, the appropriate concentrations were obtained by dilution of stock solutions of the alkaloids. Thirty minutes before the training trial, animals were given an i.p. injection of either vehicle (saline or DMSO 5% in saline) or alkaloids (1.0, 2.5 and 5.0 mg/kg) in a 10.0 ml/kg injection volume.

2.3. Behavioral procedures

The novel object recognition task is a non spatial, non aversive memory test, which has been shown to be a useful experimental tool for assessing changes in brain function in mouse genetic models (Tang et al., 1999; Rampon et al., 2000). The novel object recognition task was carried out as described in previous studies (Rosa et al., 2003; Schröder et al., 2003; de Lima et al., 2005a,b,c; Schröder et al., 2005). Briefly, the task took place in a 40 cm x 50 cm open field surrounded by 50 cm high walls, made of white plywood with a frontal glass wall. All animals were first given the opportunity to freely explore the open field for five minutes. During this habituation session the apparatus was empty and the light intensity was equal in the different parts of the apparatus (about 30 lx). Twenty-four hours after habituation, training was conducted by placing individual mice for 5 min into the field in the center of the arena, in which two identical objects (object A1 and A2; Duplo Lego Toys) were positioned in two adjacent corners at 10 cm from the walls. In a short-term memory (STM) test, given 1.5 h after training, the mice explored the open

field for 5 min in the presence of one familiar (A) and one novel (B) object. In a long-term memory (LTM) test, given 24 h after training, the mice explored the field for 5 min in the presence of familiar (A) and novel (C) objects. All objects had similar textures, colors and size, but distinctive shapes. Between each trial, the open field box and the objects were washed with 10% ethanol solution. The exploratory preference was defined as percentage of the total exploration time animal spent investigating the object A or the novel object and calculated for each animal by the ratio $T_{B \text{ or } C}/(T_A + T_{B \text{ or } C})$ [T_A = time spent exploring the familiar object A; $T_{B \text{ or } C}$ = time spent exploring the novel objects B or C). Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws.

2.4 Statistical Analysis

Data were expressed as the mean \pm S.E. percentage time exploring any of the objects (training) or the novel objects (STM or LTM test trials). Nonparametric statistics is preferred for analyzing data for memory tasks because data usually do not show a normal distribution and a ceiling is imposed for memory measures in retention test trials (Rosa et al., 2003). All comparisons among groups were performed using Kruskal - Wallis analysis of variance, followed by Mann-Whitney U-tests when necessary. Comparisons between behavioral trials within the same group were performed using Wilcoxon test (Rosa et al., 2003). In all comparisons, $P < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

3. Results

During the training session there were no significant differences between groups given vehicle or alkaloid, in terms of total time spent exploring the two objects ($H = 3$; $df = 3$ and $P > 0.05$), indicating that the all groups displayed similar exploration behaviors during this session (Table 1). These results signify that pre-training treatment with alkaloids did not affect sensorimotor parameters such as locomotion and motivation. In addition, Wilcoxon analysis performed in each experimental group showed no significant differences in exploration between two identical objects during training.

Results for exploratory preference in mice treated with the alkaloids are shown in Figures 1, 2 and 3. Animals given harmine (Fig. 1) and harmol (Fig. 2) showed no

significant preference for the new object during LTM, but significantly increased the time to explore the novel object in the STM test. Mann-Whitney analysis showed that animals treated with harmine significantly increased the time exploring the novel object ($P < 0.001$ in all groups) with values $U=3.0$, $U=6.0$ and $U=1.0$ at the doses 1.0, 2.5 and 5.0mg/kg respectively, when compared to the vehicle treated group. In the same way harmol showed a significantly higher time spent exploration the novel object in the STM test when compared to the vehicle treated group ($U=9.0$ at the dose of 1.0mg/kg and $U=0.0$ in the groups given harmol at the doses of 2.5 and 5.0mg/kg, $P < 0.001$ in all three groups.) However, animals given harmaline (Fig. 3) at 2.5 or 5.0 mg/kg spent a significantly higher time exploring the novel object in the LTM test ($P \leq 0.001$, with values $U = 8.0$ and $U=9.0$, respectively) and animals given harmaline at the lower dose (1.0 mg/kg) spent longer exploring the novel object in the STM ($P < 0.01$ and $U=5.0$). Wilcoxon tests showed there is really a significantly higher percentage of spent time exploring the novel object during either short- (harmine and harmol) or long- (harmaline) term retention test sessions in comparison with the training trial. Mice treated with harmine showed no significant differences in any of the tests analyzed (data not shown).

4. Discussion

The results showed that acute pretraining systemic administration of aromatic β -carboline alkaloids, harmine and harmol, improved novel recognition tested 1.5 h (STM) after training in mice, while the dihydro- β -carboline harmaline principally enhanced 24 h memory (LTM). There was no effect on other behavioral parameters, such as training performance and total time spent exploring both objects. However, because animals were given pretraining injections, both acquisition and early consolidation memory processes could have been affected. Thus, we cannot exclude the possibility that sensorimotor effects were involved in the improved retention test performance shown by β -carboline-treated animals. Further experiments, using post-training injections, are required to confirm that alkaloids exert cognitive enhancing action by facilitating processes specifically involved in memory formation. In addition, the finding that these alkaloids might induce memory enhancement needs to be extended to other memory tasks in future studies.

The dihydro- β -carboline harmaline showed effects on non spatial and non aversive memory tasks, enhancing principally LTM memory. On the other hand, electrophysiological evidence suggests that harmaline induced tremor by activating the inferior olivary nucleus and cerebellum (Lamarre et al., 1971; DeMontigny and Lamarre, 1973, Mehta et al., 2003). It has also been demonstrated that harmaline blocks both associative and motor learning (Du and Harvey, 1997; Welsh, 1998), although it is not known if this effect on learning and memory is mediated by the inferior olive or another area. It is unclear what role the inferior olive plays in learning and memory (Welsh and Harvey, 1998, Welsh, 1998). Although it is well known that harmaline produces tremor by activating the inferior olive, it has various actions that may affect widespread regions of the nervous system and this could be important for memory evocation.

Studies have demonstrated that harmaline binds to the MK-801 site within the NMDA receptor calcium channel (Du et al., 1997), acting as a NMDA receptor agonist (de Lima et al., 2005a). The NMDA type of glutamate receptor channel is important for induction of activity-dependent synaptic plasticity and formation of memory (Castellano et al., 2001; Roesler et al., 1999, 2003; Riedel et al., 2003); it consists of a ligand-gated channel with high calcium permeability (Du et al., 1997). Harmaline might also be involved in Ca^{2+} - homeostasis, since it is able to lower voltage-gated calcium channel currents (Splettstoesser et al., 2005). Calcium (Ca^{2+}) is a ubiquitous intracellular signal, responsible for controlling numerous cellular processes (Agrawal et al., 1996), which plays an essential role in synaptic communication (Yamauchi, 2005). Calcium influx activates cellular signaling pathways involved in memory consolidation, such as protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC), and mitogen-activated protein kinase (MPAK) pathways (Walz et al., 1999; Izquierdo et al., 1999; Vianna et al., 2000; Quevedo et al., 2004).

Memory is not a single process and can take place with different durations and specific biological purposes (Quevedo et al., 2004), including modulation by dopaminergic D1, serotonergic (5HT1A) and β -adrenergic receptors in areas such as CA1 and the hippocampus (Izquierdo et al., 1998). The brain dopaminergic systems play an important role in cognitive functions and can enhance memory consolidation in a variety of spatial and non spatial/ contextual tasks (Gestari et al., 1992; Castellano et al., 1991; Pakdel and Rashidy-Pour, 2006). The β -carboline alkaloids show modest affinity to serotonin (5-HT2A, 5-HT2C and 5-HT1A), dopamine and benzodiazepine receptors and this affinity is

highly dependent upon substitutions and ring saturation. The fully aromatic β -carbolines show more affinity to these receptors and the substitution in C7 also seems to be important in modifying its affinity for these receptors (Glennon et al., 2000). The enhancement of STM induced by harmol and harmine, fully aromatic β -carbolines, may involve interactions with these receptor systems. These alkaloids also inhibit MAO-A in vitro by reversibly binding with high affinity to the active site of the enzyme (Herraiz and Chaparro, 2005). Methoxyl group in C7 position favors the inhibition of MAO-A and molecule planarity is important for the formation of the complex with riboflavin (May et al., 1994; Kim et al., 1997). These possibilities could explain the inhibition of MAO-A, increasing extracellular dopamine and serotonin levels, and therefore resulting in the enhanced memory observed for harmine, harmol and harmaline alkaloids.

Harmane showed no effect on the formation of STM and LTM. This alkaloid has a fully unsaturated pyridine ring, but no group substitution in C7. This could explain its lack of activity in memory enhancement.

In summary, the present study provides evidence that systemic administration of the β -carboline and dihydro- β -carboline alkaloids can induce a facilitation of STM and/or LTM in a novel object recognition task in mice. Studies on these alkaloids are controversial; they may show either a decrease (Splettstoesser et al., 2005) or an increase (Du et al., 1997) in neuronal excitability and anxiety (Hilber and Chapillon, 2005). Studies in the past have indicated that β -carbolines are potentially hallucinogenic (Freedland and Mansbach, 1999), that harmaline also produces tremor (Lamarre et al., 1971) and exerts effects on learning (Du and Harvey, 1997; Welsh, 1998). We have shown that it can also have an action on memory acquisition. Further experiments in other rodent models of learning tasks and memory are necessary to clarify the mechanisms of action of these alkaloids.

5. Acknowledgments

We thank Dr. Martin Brendel and Dr. Cristine Gaylard for great discussions of this paper. This work was supported by grants from the Brazilian Agencies Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Universidade Regional Integrada

do Alto Uruguai e das Missões (PROBIC/URI) and Genotoxicity Laboratory, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (GENOTOX).

References

Agrawal, S.K., Fehlings, M.G., 1996. Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: role of Na^+ , $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, the $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchanger, and the $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger. *The Journal of Neuroscience* 16 (2), 545-552.

Albores, R., Neafsey, E.J., Drucker, G., Fields, J.Z., Collins, M.A., 1990. Mitochondrial respiratory inhibition by N-methylated beta-carboline derivatives structurally resembling N-methyl-4-phenylpyridine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (23), 9368-9372.

Boeira, J.M., Silva, J., Erdtmann, B., Henriques, J.A.P., 2001. Genotoxic effects of the alkaloids Harman and Harmine by Comet assay and chromosome aberration test in mammalian cells in vitro, *Pharmacology & toxicology* 89 (6), 287-294.

Boeira, J.M., Viana, A.F., Picada, J.N., Henriques, J.A.P., 2002. Genotoxic and recombinogenic activities of the two beta-carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research* 500 (1-2), 39-48.

Castellano, C., Gestari, V., Ciamei, A., 2001. NMDA receptors and learning and memory processes. *Current Drug Targets* 2 (3), 273-283.

Castellano, C., Cestari, V., Cabib, S., Puglisi-Allegra, S., 1991. Post-training dopamine receptor agonists and antagonists affect memory storage in mice irrespective of their selectivity for D1 or D2 receptor. *Behavioral and Neural Biology* 56 (3), 283-291.

Cestari, V., Castellano, C., Cabib, S., Puglisi-Allegra, S., 1992. Strain dependent effects of post-training dopamine receptor agonist and antagonist on memory storage in mice. *Behavioral and Neural Biology* 58 (1), 58-63.

de Lima, M.N., Laranja, D.C., Bromberg, E., Roesler, R., Schröder, N., 2005a. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behavioural Brain Research* 156 (1), 139-143.

de Lima, M.N., Laranja, D.C., Caldana, F., Bromberg, E., Roesler, R., Schröder, N., 2005b. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. *Experimental Gerontology* 40 (6), 506-511.

de Lima, M.N., Polydoro, M., Laranja, D.C., Bonatto, F., Bromberg, E., Moreira, J.C., Dal-Pizzol, F., Schröder, N., 2005c. Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. *The European Journal of Neuroscience* 21 (9), 2521-2528.

DeMontigny, C. and Lamarre, Y., 1973. Rhythmic activity induced by harmaline in the olive-cerebello-bulbar system of the cat. *Brain Research* 53 (1), 81-95.

Du, W., Aloyo, V.J., Harvey, J.H., 1997. Harmaline competitively inhibits [³H]MK-801 binding to the NMDA receptor in rabbit brain. *Brain Research* 770 (1-2), 26-29.

Du, W., Harvey, J.A., 1997. Harmaline-induced tremor and impairment of learning are both blocked by dizocilpine in the rabbit. *Brain Research* 745 (1-2), 183-188.

Ennaceur, A., Delacour, J., 1998. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research* 31 (1), 47-59.

Freedland, C.S.; Mansbach, R.S., 1999. Behavioral profile of constituents in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant mixture. *Drug and alcohol dependence* 54 (3), 183-194.

Glennon, R. A., Dukat, M., Grella, B., Hong, S.S., Costantino, L., Teitler, M., Smith, C., Egan, C., Davis, K., Mattson, M.V., 2000. Binding of beta-carbolines and related agents at

serotonin (5-HT(2) and 5-HT(1A)), dopamine (D(2)) and benzodiazepine receptors. *Drug and Alcohol Dependence* 60 (2), 121-132.

Herraiz, T., Chaparro, C., 2005. Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: β -carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326 (2), 378-386.

Hilber, P., Chapillon, P., 2005. Effects of harmaline on anxiety-related behavior in mice. *Physiology & behavior* 86 (1-2), 164-167.

Izquierdo, I., Medina, J., Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Souza, M.M., Mello e Souza, T., 1998. Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. *Neurobiology of Learning and Memory* 69 (3), 219-224.

Izquierdo, I., Medina, J., Vianna, M.R.M., Izquierdo, L.A., Barros, D.M., 1999. Separate mechanisms for the short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research* 103, 1-11.

Kim, D.H., Jang, Y.Y., Han, E.S., Lee, C.S., 2001. Protective effect of harmaline and harmalol against dopamine and 6-hydroxydopamine- induced oxidative damage of brain mitochondria and synaptosomes, and viability loss of PC12 cells. *The European Journal of Neuroscience* 13 (10), 1861-1872.

Kim, H., Sablin, S.O., Ramsay, R.R., 1997. Inhibition of monoamine oxidase A by β -carboline derivates. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 337 (1), 137-142.

Lamarre, Y., DeMontigny, C., Dumont, M., Weiss, M., 1971. Harmaline-induced rhythmic activity of cerebellar and lower brain stem neurons. *Brain Research* 32 (1), 246-250.

Lamarre, Y., Mercier, L.A., 1971. Neurophysiological studies of harmaline-induced tremor in the cat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 49 (12), 1049-1058.

Lamarre, Y., Puil, E., 1974. Induction of rhythmic activity by harmaline. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 52 (4), 905-908.

Lee, S.L., Han, E.S., Jang, Y.Y., Han, J.H., Ha, H.W., Kim, D.E., 2000. Protective effect of harmalol and harmaline on MPTP neurotoxicity in the mouse and dopamine-induced damage of brain mitochondria and PC12 cells. *Journal of Neurochemistry* 75 (2), 521-531.

Madle, E., Obe, G., Hansen, J., Ristow, H., 1981. Harman and norharmane: induction of sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes in vitro and interaction with isolated DNA. *Mutation Research* 90 (4), 433-442.

Maher, P., Davis, J.B., 1996. The role of monoamine metabolism in oxidative glutamate toxicity. *The Journal of Neuroscience* 16 (20), 6394-6401.

May, T., Greube, A., Strauss, S., Heineke, D., Lehmann, J., Rommespacher, H., 1994. Comparison of the in vitro binding characteristics of the beta-carbolines harmane and norharmane in rat brain and liver and in bovine adrenal medulla. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 349 (3), 308-317.

Mehta, H., Saravanan, K.S., Mohanakumar, K.P., 2003. Serotonin synthesis inhibition in olivo-cerebellar system attenuates harmaline-induced tremor in Swiss albino mice. *Behavioural Brain Research* 145 (1-2), 31-36.

Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., 1988. Harman and norharman induce SOS responses and frameshift mutations in bacteria. *Mutation Research* 208 (1), 39-44.

Pakdel, R., Rashidy-Pour, A., 2006. Glucocorticoid-induced impairment of long-term memory retrieval in rats: An interaction with dopamine D2 receptor. *Neurobiology of learning and memory* 85 (3), 300-306.

Park, T.H., Kwon O.S., Park, S.Y., Han, E.S., Lee, C.S., 2003. N-methylated β -carbolines protect PC12 cells from cytotoxic effects of MPP⁺ by attenuation of mitochondrial membrane permeability change. *Neuroscience Research* 46 (3), 349-358.

Pfau, W., Skog, K., 2004. Exposure to β -carbolines norharman and harman. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 802 (1), 115-126.

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 (2), 135-149.

Pimpinella, G., Palmery, M., 1995. Interaction of β -carbolines with central dopaminergic transmission in mice: structure-activity relationships. *Neuroscience Letters* 189 (2), 121-124.

Puma, C., Deschaux, O., Molimard, R., Bizot, J.C., 1999. Nicotine improves memory in an object recognition task in rats. *European Neuropsychopharmacology* 9 (4), 323-327.

Quevedo, J., Vianna, M.R., Martins, M.R., Barichello, T., Medina, J.H., Roesler, R., Izquierdo, I., 2004. Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. *Behavioural Brain Research* 154 (2), 339-343.

Rampon, C., Tang, Y.P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyin, M., Tsien, J.Z., 2000. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nature Neuroscience* 3 (3), 238-244.

Riedel, G., Platt, B., Micheau, J., 2003. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioral Brain Research* 140 (1-2), 1-47.

Roesler, R., Vianna, M.R.M., Paris, F., Quevedo, J., 1999. Memory-enhancing treatments do not reverse the impairment of inhibitory avoidance retention induced by NMDA receptor blockade. *Neurobiology of Learning and Memory* 72 (3), 252-58.

Roesler, R., Schröder N., Vianna, M.R.M., Quevedo, J., Bromberg, E., Kapczinski, F., Ferreira, M.B.C., 2003. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Research* 975 (1-2), 207-213.

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

Rosa, R.M., Flores, D.G., Appelt, R., Braga, A.L., Henriques, J.A.P., Roesler, R., 2003. Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. *Neuroscience Letters* 341 (3), 217-220.

Schröder, N., de Lima, M.N., Quevedo, J., Dal-Pizzol, F., Roesler, R., 2005. Impairing effects of chronic haloperidol and clozapine treatment on recognition memory: possible relation to oxidative stress. *Schizophrenia Research* 73 (2-3), 377-378.

Schröder, N., O'Dell, S.J., Marshall, J.F., 2003. Neurotoxic methamphetamine regimen severely impairs recognition memory in rats. *Synapse* 49 (2), 89-96.

Splettstoesser, F., Bonnet, U., Wirmann, M., Bingmann, D., Busselberg, D., 2005. Modulation of voltage-gated channel currents by harmaline and harmane. *British Journal of Clinical Pharmacology* 144 (1), 52-58.

Squires, E.P., Hills, C.E., Rogers, G.J., Garland, P., Farley, S.R., Morgan, N.G., 2004. The putative imidazoline receptor agonist, harmane, promotes intracellular calcium mobilization in pancreatic beta-cells. *European Journal of Pharmacology* 501 (1-3), 31-39.

Tang, Y.P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zhuo, M., Liu, G., Tsien, J.Z., 1999. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401 (6748), 63-69.

Thoda, H., Tada, M., Sugawara, R., Oikawa, A., 1983. Actions of amino- β -carbolines on induction of sister-chromatid exchanges. *Mutation Research* 116 (2), 137-147.

Vianna, M.R.M, Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Walz, R., Median, J.H., Izquierdo, I., 2000. Short- and long-term memory: differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 72 (3), 353-364.

Walz, R., Rockembach, I.C., Amaral, O.B., Quevedo, J., Roesler, R., 1999. MAPK and memory. *Trends in Neurosciences* 22 (11), 495.

Welsh, J.P., 1998. Systemic harmaline blocks associative and motor learning by the actions of the inferior olive. *The European Journal of Neuroscience* 10 (11), 3307-3320.

Welsh, J.P., Harvey, J.A., 1998. Acute inactivation of the inferior olive blocks associative learning. *The European Journal of Neuroscience* 10 (11), 3321-3332.

Yamauchi, T., 2005. Neuronal Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II- discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: Implication for learning and memory. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28 (8), 1342-1354.

Results

Table 1. Total amount of time spent exploring both objects during object recognition training in mice given an i.p. injection of saline or alkaloids (1.0, 2.5 or 5.0 mg/kg) 30 min before training.

Group	Time exploring objects (s)
Vehicle (saline)	87.94 ± 9.50
Harmine 1.0 mg/kg	80.53 ± 8.17
Harmine 2.5 mg/kg	85.86 ± 9.99
Harmine 5.0 mg/kg	89.27 ± 11.94
Vehicle (DMSO 5% in saline)	94.35 ± 13.3
Harmol 1.0 mg/kg	91.93 ± 13.49
Harmol 2.5 mg/kg	89.90 ± 10.25
Harmol 5.0 mg/kg	96.2 ± 8.22
Vehicle (DMSO 5% in saline)	89.16 ± 2.62
Harmaline 1.0 mg/kg	84.01 ± 4.97
Harmaline 2.5 mg/kg	87.49 ± 5.30
Harmaline 5.0 mg/kg	91.04 ± 9.09
Vehicle (DMSO 5% in saline)	80.81 ± 7.25
Harmane 1.0 mg/kg	80.61 ± 6.71
Harmane 2.5 mg/kg	91.07 ± 8.23
Harmane 5.0 mg/kg	87.91 ± 5.35

Data are expressed as mean ± S.E; $N = 10$ animal per group. There were no significant differences among groups: harmine $P = 0.96$, harmol $P = 0.96$, harmaline $P = 0.72$ and harmane $P = 0.69$. Analyses of variance among groups were done using Kruskal-Wallis Test.

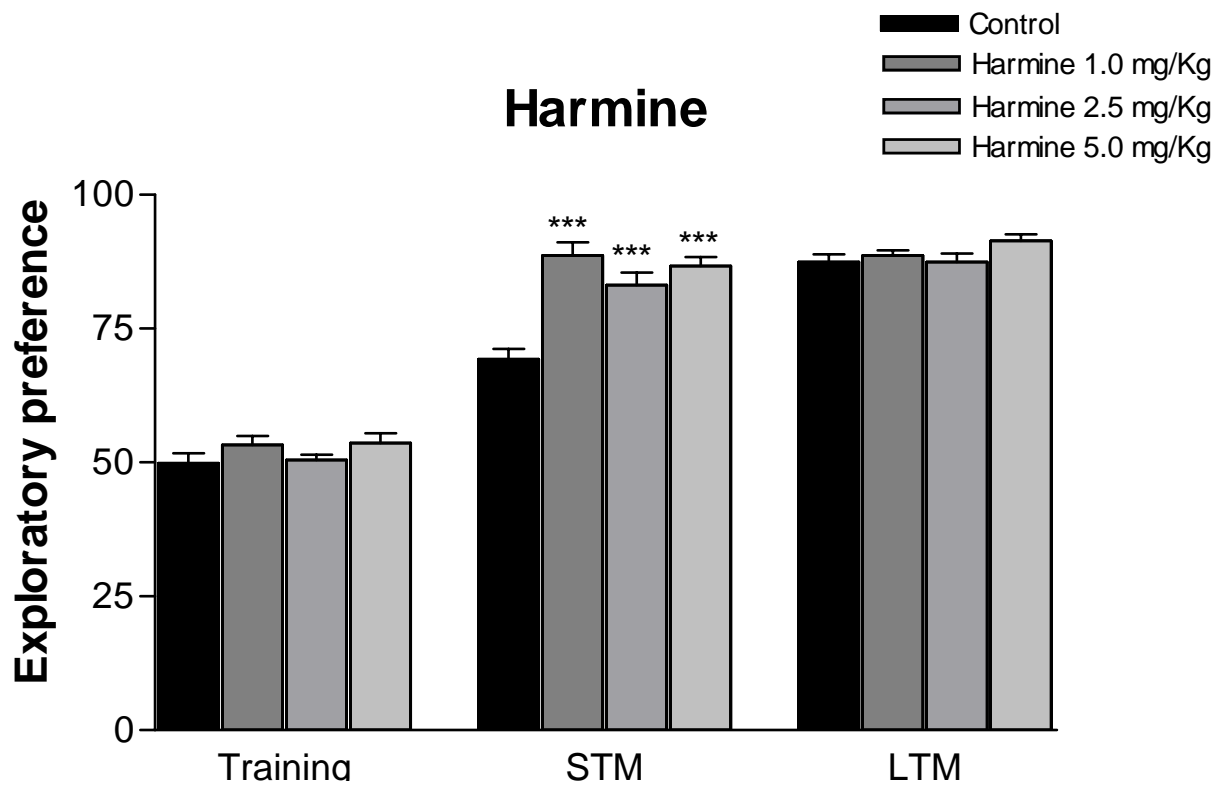


Figure 1. Effect of i.p. injection of harmine (1.0, 2.5 or 5.0 mg/kg), 30 min pre-training, on memory novel object recognition task in mice. Results are shown as mean \pm S.E. exploration time in training, short-term memory (STM) and long-term memory (LTM) retention test trials. N = 10 animals per group. Data significant in relation to vehicle group (saline) at $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$ /Kruskal-Wallis analyses of variance followed by Mann-Whitney U-tests.

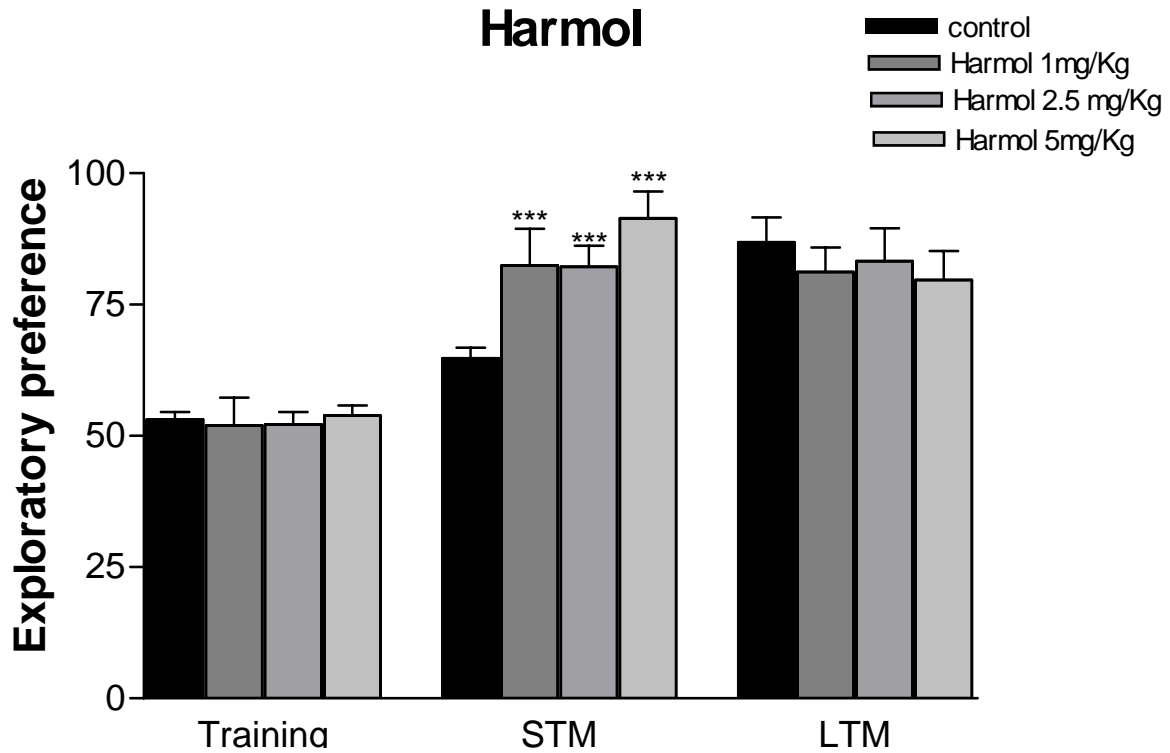


Figure 2. Effect of i.p. injection of harmol (1.0, 2.5 or 5.0 mg/kg), 30 min pre-training, on memory novel object recognition task in mice. Results are shown as mean \pm S.E. exploration time in training, short-term memory (STM) and long-term memory (LTM) retention test trials. N = 10 animals per group. Data significant in relation to vehicle group (saline with DMSO 5%) at $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$ /Kruskal-Wallis analyses of variance followed by Mann-Whitney U-tests.

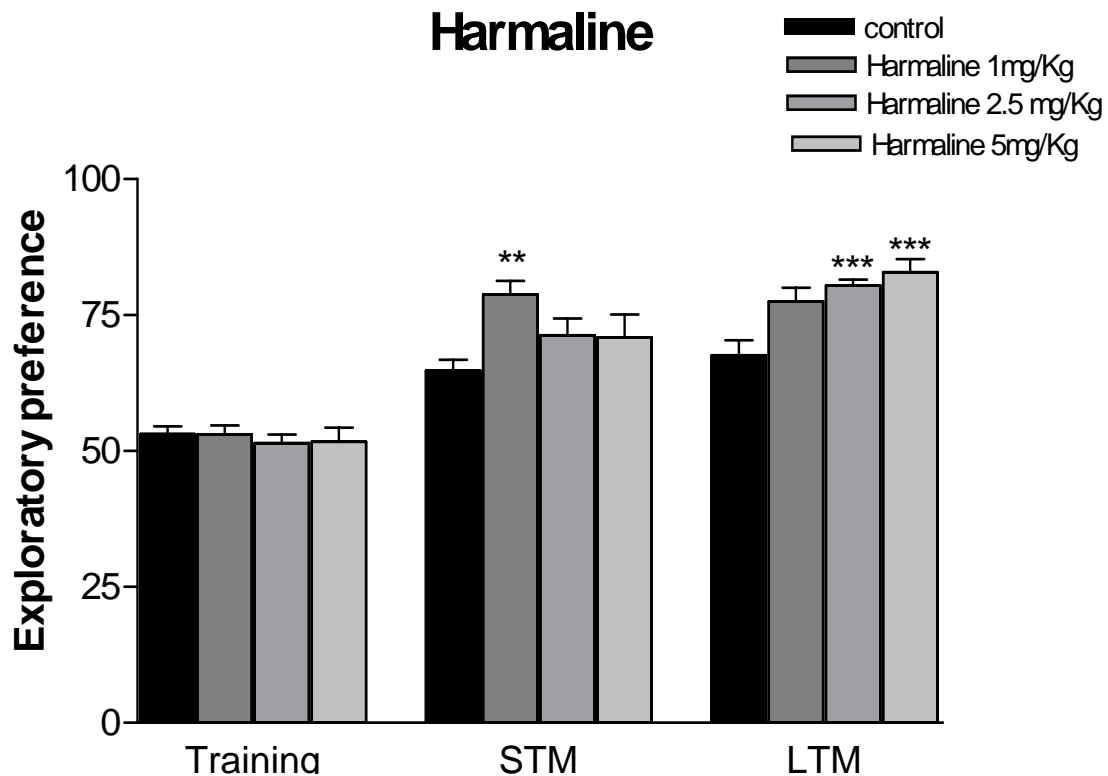


Figure 3. Effect of i.p. injection of harmaline (1.0, 2.5 or 5.0 mg/kg), 30 min pre-training, on memory novel object recognition task in mice. Results are shown as mean \pm S.E. exploration time in training, short-term memory (STM) and long-term memory (LTM) retention test trials. N = 10 animals per group. Data significant in relation to vehicle group (saline with DMSO 5%) at *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001/Kruskal-Wallis analyses of variance followed by Mann-Whitney U-tests.

V. DISCUSSÃO GERAL

Os alcalóides β -carbolínicos estão presentes em uma variedade de famílias de plantas, em alimentos, bebidas alcoólicas, fumaça de cigarro, e também endogenamente em animais, inclusive mamíferos (ALLEN & HOLMSTEDT, 1980; MEESTER, 1995; HENRIQUES *et al.*, 1999; ZHENG *et al.*, 2000). Nos vegetais, originam-se do aminoácido triptofano através da condensação de Mannich entre a triptamina e um aldeído ou α -cetoácido (HUSSON, 1985), enquanto que nos mamíferos, acredita-se que as β -carbolinas sejam formadas endogenamente pela reação de Pictet-Spengler em uma reação análoga à observada nos vegetais (para revisão ver, DUCROT *et al.*, 2000).

Os alcalóides β -carbolínicos utilizados neste estudo estão divididos em dois grupos: o primeiro é formado por harmano, harmina e harmol, os quais possuem anel piridínico aromático, pertencentes ao sistema β -carbolina; o segundo pertence ao sistema dihidro- β -carbolina, sendo formado por harmalol e harmalina, que apresentam anel piridínico parcialmente insaturado.

As β -carbolinas apresentam inúmeras propriedades farmacológicas, especialmente sobre os sistemas muscular e cardiovascular e sistema nervoso central, causando alucinações, tremores, convulsões, hipotensão e bradicardia (ERGENE & SCHOENER, 1993; MEERT, 1994). São potentes inibidores da MAO-A e interagem com alguns receptores, entre eles, serotoninérgicos, dopaminérgicos, benzodiazepínicos e imidazólicos (ROMMELSPACHER *et al.*, 1994; PIMPINELLA & PALMERY, 1995; KIM *et al.*, 1997; GRELLA *et al.*, 1998; GLENNON *et al.*, 2000; HUSBANDS *et al.*, 2001). Alguns estudos indicam atividade antioxidante e imunossupressora para estes alcalóides (TSE *et al.*, 1991; PERES, 1999; LEE *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2003).

Efeitos tóxicos e mutagênicos dos alcalóides β -carbolínicos foram demonstrados em células procariotas e eucariotas, sendo que a ação destes alcalóides é dependente da estrutura e da concentração dos mesmos (MADLE *et al.*, 1981; THODA *et al.*, 1983; HAZEN & GUTIÉRREZ-GONZÁLVEZ, 1988; SASAKI *et al.*, 1992; PICADA *et al.*, 1997; ODA *et al.*, 1998; BOEIRA *et al.*, 2001; 2002).

Com o intuito de ampliar o conhecimento sobre estes alcalóides, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antioxidante dos mesmos utilizando dois sistemas

eucariotos, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e células V79, de pulmão de hamster chinês (Capítulo I). Também foram avaliados os efeitos dos alcalóides β -carbólicos sobre neurocomportamento, através de estudos de memória (Capítulo II).

1. Atividades antioxidante e antimutagênica em levedura e antígenotóxica em cultura de células de mamíferos

Como demonstrado no capítulo I, os alcalóides β -carbólicos protegeram as células contra os oxidantes H_2O_2 e paraquat na levedura *S. cerevisiae* e nas células de pulmão de hamster chinês (V79). Em ambos os ensaios, as dihidro- β -carbólicas harmalina e harmolol, causaram um efeito mais pronunciado que as β -carbólicas aromáticas harmano, harmina e harmol.

Os resultados apresentados na Figura 1 do Anexo I mostram que os alcalóides nas doses e condições experimentais utilizadas não foram citotóxicos para as diferentes linhagens da levedura *S. cerevisiae* usadas neste estudo, uma vez que não diminuíram significativamente a viabilidade das células. Para verificar uma possível atividade antioxidante dos alcalóides, as células foram previamente tratadas com os alcalóides e em seguida com os oxidantes (H_2O_2 e paraquat) nas mesmas condições. Como mostrado na Figura 2 e 3 do Capítulo I, as linhagens mutantes *sod1 Δ* , *sod2 Δ* e *sod1 Δ sod2 Δ* demonstraram um significativo aumento da sobrevivência, após a exposição aos oxidantes. O efeito sobre o aumento da sobrevivência, de modo geral, foi mais significativo após o tratamento com H_2O_2 (Figura 2 do Capítulo I).

Na presença de íons ferro, o H_2O_2 pode originar um dos intermediários mais reativos do oxigênio, o radical $OH\cdot$ através da reação de Fenton (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). Em condições aeróbicas de crescimento os mutantes *sod1 Δ* e *sod2 Δ* apresentam níveis maiores de ferro (até 5 vezes), assim como a duplo mutante *sod1 Δ sod2 Δ* (até 9 vezes), detectado por Ressonância Paramagnética de Elétron (EPR), em relação aos níveis basais da linhagem selvagem isogênica (SRINIVASAN *et al.*, 2000). Além disso, o gene *SOD1* é regulado pelo fator de transcrição Ace1, o qual controla a indução do gene *CUP1* (que codifica uma metalotioneína) em resposta a níveis elevados de cobre (CARRI *et al.*, 1991; GRALLA *et al.*, 1991), sugerindo defesa a radical superóxido e homeostase de metais (MARIS *et al.*, 1999). Já o radical superóxido, gerado pelo tratamento com paraquat, tem sua toxicidade baseada na observação de que o superóxido

pode especificamente oxidar o sítio [4Fe-4S] de certas enzimas, causando a liberação de ferro do sítio e a inativação da enzima (LIOCHEV & FRIDOVICH, 1994; MURAKAMI & YOSHINO, 1997; FREITAS, 2000). Esse processo levaria a dano oxidativo uma vez que o ferro livre pode promover, via reação de Fenton, a formação do radical OH•. Portanto, com base nos resultados obtidos nestes mutantes, pode-se sugerir uma possível ação dos alcalóides β-carbolínicos sobre radical OH•. Outro ponto importante a ser considerado é a resposta antioxidante observada nos mutantes *yap1* para a maioria dos alcalóides, especialmente para as dihidro-β-carbolinas (Figuras 2D, 2E, 3D e 3E do Capítulo I). O fator de transcrição Yap1 é apontado como um dos mais importantes mediadores das respostas adaptativas ao estresse em *S. cerevisiae*, modulando a indução de genes de defesa contra agentes oxidantes como H₂O₂ e gerados de radicais superóxido (SCHNELL *et al.*, 1992; DORMER *et al.*, 2002). Dessa forma, mutantes *yap1Δ* são muito sensíveis a agentes oxidantes (KUGE & JONES, 1994; STEPHEN *et al.*, 1995; DELAUNAY *et al.*, 2000). Os efeitos protetores observados na linhagem *yap1Δ* sugerem fortemente que a atividade antioxidante observada para a maioria dos alcalóides não foi devido à indução de sistemas adaptativos da levedura *S. cerevisiae* e, sim por uma ação direta dos alcalóides β-carbolínicos contra ERO.

A capacidade das β-carbolinas de seqüestrar radical OH• foi confirmada pelo ensaio *in vitro* da hipoxantina/xantina oxidase. Como mostrado na Figura 4 do Capítulo I houve uma significativa diminuição na concentração dos ácidos dihidroxibenzóicos (DHBA), produtos da ação do radical OH• sobre o ácido salicílico (OWEN, 1996). Estes resultados estão de acordo com os publicados por LEE *et al.* (2000) que, usando o sistema que mede a inibição da degradação da desoxirribose mostraram uma significativa ação neutralizante dos alcalóides β-carbolínicos, especialmente harmalina e harmalol, sobre radical OH•. Esses autores também comprovaram que esses alcalóides atenuam danos oxidativos cerebrais de camundongos tratados com o agente MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), o qual mimetiza a Doença de Parkinson, induzindo danos mitocondriais.

Espécies reativas de oxigênio produzem uma série de lesões no DNA, danificando bases, deoxiriboses, causando quebras simples de cadeia, criando sítiosapurínicos e pirimidínicos (sítios AP) e ligações cruzadas entre DNA e proteínas por uma série de mecanismos (DIZDAROGLU, 1993). Com base nisto, avaliou-se também neste trabalho a

capacidade protetora ao DNA dos alcalóides β -carbolínicos pelos ensaios de anti-mutagenicidade na levedura *S. cerevisiae* e antigenotoxicidade em cultura de células de mamífero (V79).

Para determinar os efeitos mutagênicos e antimutagênicos dos alcalóides β -carbolínicos, foi utilizada a linhagem selvagem N123 de *S. cerevisiae*. Como mostrado na Figura 2 do Anexo I, os alcalóides β -carbolínicos sozinhos não induziram mutagênese e nem citotoxicidade nas concentrações e condições de tratamento utilizadas. Estes dados estão de acordo com os de BOEIRA *et al.* (2001), que utilizando a linhagem XV185-14c de *S. cerevisiae*, mostraram que harmano e harmina não induzem nenhum efeito mutagênico em fase estacionária de crescimento quando tratadas em PBS. Entretanto, na fase exponencial este efeito começa a aparecer, a partir da dose de 100 $\mu\text{g/mL}$ desses dois alcalóides. PICADA *et al.* (1997) demonstraram, utilizando teste de Ames em *Salmonella typhimurium* nas linhagens TA97, TA98, TA100 e TA102, que harmina, harmano e harmol possuem indícios de atividade mutagênica, mas que, neste sistema as dihidro- β -carbolinas não são mutagênicas.

Os resultados observados na Tabela 2 do Capítulo I mostram que todas as β -carbolinas possuem forte atividade antimutagênica para a linhagem N123 de levedura tratada com H_2O_2 . Esse resultado sugere que a inibição da mutagenicidade pelos alcalóides possa estar associada aos seus efeitos antioxidantes. Resultado semelhante foi obtido pelo ensaio cometa com células V79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês), complementando os resultados sobre atividade antigenotóxica. Novamente, nas concentrações utilizadas, os alcalóides sozinhos não induziram genotoxicidade. Como mostrado na Figura 3 do Anexo I, os alcalóides não aumentaram significativamente o índice e a frequência de dano: somente harmina, harmano e harmol mostraram indícios de mutagenicidade com uma leve significância nas doses mais altas utilizadas neste estudo, segundo BOEIRA *et al.* (2001), a citotoxicidade dos alcalóides harmano e harmina em células V79 é dependente da concentração utilizada. Os alcalóides β -carbolínicos aromáticos (harmano, harmina e harmol) são intercalantes do DNA, característica esta que tenha possivelmente favorecido o aumento de danos (índice e frequência) nas doses mais altas utilizadas.

Para avaliar o efeito protetor dos alcalóides β -carbolínicos em células de mamíferos, após pré-tratamento com os alcalóides, as células foram tratadas com H_2O_2 .

Como verificado na Tabela 3 do Capítulo I, todos os alcalóides diminuíram a frequência e o índice de danos induzidos pelo agente oxidante, confirmando o efeito protetor destes alcalóides frente a ERO, também observados em levedura. Vários estudos utilizando células de mamíferos PC12, com diferentes indutores de ERO demonstram o efeito sequestrador dos alcalóides β -carbolínicos (LEE *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2003). Provavelmente, esta ação protetora dos alcalóides β -carbolínicos contra quebras induzidas por H_2O_2 no DNA, observada tanto em levedura quanto em células de mamíferos, seja por uma ação antioxidante, onde os alcalóides estão agindo como sequestradores de ERO, especialmente sobre radical $OH\bullet$.

Precusores indólicos das β -carbolinas, como o triptofano e triptaminas, são conhecidos por possuírem forte atividade antioxidante, possivelmente por uma ação sequestradora de radicais livres e formação de um radical indol estável no anel piridínico (UEMURA *et al.*, 1988; DEFELIPPIS *et al.*, 1989; CRISTEN *et al.*, 1990). TSE *et al.* (1991) sugerem que o núcleo indólico das β -carbolinas pode possuir propriedades antioxidantes similares. O harmano mostrou a mais forte atividade antioxidante, nos ensaios *in vitro* (Figura 4 do Capítulo I), o que poderia ser explicado pelo seu núcleo indólico. Entretanto o mesmo não foi observado para os ensaios nos mutantes de *S. cerevisiae*. O fato de este alcalóide ser um agente intercalante no DNA (DUPORTAIL *et al.*, 1975; HAYASHI *et al.*, 1977; PICADA *et al.*, 1997; BOEIRA *et al.*, 2001), possivelmente tenha diminuído a eficácia antioxidante deste alcalóide na levedura e, conseqüentemente, a sua reduzida atividade antimutagênica e antigenotóxica, quando comparados aos demais alcalóides testados.

Em resumo, os dados apresentados no Capítulo I demonstram claramente a atividade antioxidante tanto *in vitro* quanto *in vivo* dos alcalóides β -carbolínicos, a qual é dependente da estrutura química e da concentração dos mesmos. Conforme sugerido por TSE *et al.* (1991) a desidrogenação do anel piridínico (por exemplo, harmalol para harmano; harmalina para harmina) e a substituição do grupo hidroxil por um grupo metoxil no carbono 7 (harmalol para harmalina; harmol para harmina) resultam em uma diminuição na eficácia antioxidante. Estes mesmos resultados foram observados no presente trabalho, o que nos leva a sugerir eficácia antioxidante dos alcalóides na seguinte ordem decrescente: harmalol>harmalina>harmol>harmano>harmina.

2. Efeito dos alcalóides β -carbolínicos sobre a memória

Em relação à avaliação dos efeitos neurocomportamentais, a tarefa de reconhecimento de novo objeto em roedores constitui uma excelente ferramenta para detectar alterações nas funções neurais induzidas por drogas (RAMPON *et al.*, 2000). A memória de reconhecimento é uma memória não aversa e não espacial formada a partir da ativação de receptores glutamatérgicos na região hipocampal do cérebro (RAMPON *et al.*, 2000). Os alcalóides β -carbolínicos aromáticos induziram facilitação da memória de curta duração (STM-*short term memory*) enquanto as dihidro- β -carbolinas aumentaram principalmente a memória de longa duração (LTM-*long term memory*). A harmalina aumentou significativamente a LTM nas duas doses mais altas utilizadas e a STM na dose mais baixa utilizada, como mostrado na Figura 3 do Capítulo II. Trabalhos anteriores mostram que a harmalina compete com MK-801 pela ligação a receptores de glutamato do tipo NMDA, mas ao contrário de MK-801 que atua bloqueando o canal de cálcio do receptor, harmalina atua assim como agonista do receptor NMDA, ou seja, favorece a abertura dos canais de cálcio (DU *et al.*, 1997), além disso, harmalina está envolvida na homeostase de cálcio (SPLETTTOESSER *et al.*, 2005). Vários estudos (ROESLER *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2005) têm demonstrado que o receptor NMDA, um canal com alta permeabilidade ao cálcio, é importante para indução de plasticidade sináptica e formação de memória. O cálcio por sua vez é um segundo mensageiro universal responsável pelo controle de numerosos processos celulares e tem um papel essencial na comunicação sináptica (AGRAWAL *et al.*, 1996; YAMAUCHI, 2005). As β -carbolinas possuem modesta afinidade aos receptores de serotonina (5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} and 5-HT_{1A}), dopamina e benzodiazepínicos e esta afinidade é altamente dependente da saturação e dos substituintes no anel. As β -carbolinas aromáticas (harmano, harmina e harmol) mostram mais afinidades para estes receptores e a substituição no C7 é importante para esta afinidade (GLENNON *et al.*, 2000). As vias dopaminérgicas e serotoninérgicas podem aumentar STM em roedores. Sendo assim provavelmente o aumento de STM induzido por harmol e harmalina conforme Figuras 1 e 2 do Capítulo II possa envolver interações com estas duas vias. Além disso, estes alcalóides são inibidores da MAO-A por ligação irreversível com alta afinidade pelo sítio ativo da enzima (HERRAIZ & CHAPARRO, 2005). A metoxilação no C7 favorece a inibição da MAO-A e a planaridade da molécula é importante para a formação do complexo com a riboflavina (MAY *et al.*, 1994; KIM *et al.*,

1997). Uma possibilidade é que a inibição da MAO-A aumente os níveis de dopamina e serotonina já que o aumento da memória induzido por harmalina, harmina e harmol pode estar envolvido com dopamina e serotonina. O harmano, por sua vez não mostrou resultados significativos no aumento da memória (Figura 1 do Anexo I).

Este trabalho é, portanto, mais uma contribuição ao estudo dos efeitos biológicos dos alcalóides β -carbolínicos, tanto os pertencentes ao grupo dos aromáticos (harmano, harmina e harmol), quando dos di-hidro (harmalina e harmalol). Seus efeitos antioxidantes e antimutagênicos foram claramente demonstrados na levedura. Além disso, a atividade antigenotóxica contra quebras no DNA induzidas por espécies reativas de oxigênio ficou também evidenciada, por ensaio cometa com cultura células de mamíferos. As di-hidro β -carbonilas harmalina e harmalol demonstraram os efeitos protetores mais significativos, comprovando a correlação estrutura/atividade para esses alcalóides. Além disso, ficou evidenciado que os alcalóides β -carbolínicos podem atuar sobre mecanismos envolvidos nos processos de aprendizagem e memória, facilitando a STM e LTM em camundongos.

VI – CONCLUSÕES

1. Conclusão Geral

Os resultados apresentados neste estudo revelam que os alcalóides β -carbolínicos nos dois sistemas eucariotos, levedura *S. cerevisiae* e em cultura de células de pulmão de hamster chinês (V79), foram antioxidantes, antimutagênicos e antígenotóxicos. Além disso, os resultados indicam que os alcalóides β -carbolínicos facilitam a memória de curta e de longa duração em camundongos.

2. Conclusões Específicas

- Os alcalóides β -carbolínicos possuem atividade antioxidante em linhagens de *S. cerevisiae* selvagens e mutantes deficientes em sistemas antioxidantes.
- Os efeitos mais pronunciados da atividade antioxidante nas linhagens da levedura *S. cerevisiae* foram verificados contra H_2O_2 .
- Os alcalóides não induzem, nas condições experimentais utilizadas neste trabalho, sistemas de adaptação ao estresse oxidativo em linhagens de *S. cerevisiae* selvagens e deficientes em sistemas antioxidantes, pois houve um aumento da sobrevivência no mutante *yap1* Δ quando pré-tratado com os alcalóides e após tratamento com os oxidantes.
- As dihidro- β -carbolinas, harmalina e harmalol mostraram-se mais eficazes no aumento da sobrevivência em linhagens de *S. cerevisiae* após tratamento com oxidantes, mostrando pronunciado efeito antioxidante neste sistema.
- Os alcalóides protegeram as células da levedura *S. cerevisiae* da mutagênese induzida pelo H_2O_2 , mostrando forte atividade antimutagênica.

- Os índices e as frequências de danos sobre o DNA, detectados pelo ensaio cometa em células V79, em presença de H₂O₂ também indicam que os alcalóides β-carbolínicos protegem dos danos ao DNA induzidos pelo referido oxidante, confirmando a forte atividade antígenotóxica.
- Harmalina e harmalol também demonstram um efeito antimutagênico e antígenotóxico mais pronunciado que as β-carbolinas aromáticas, harmina, harmano e harmol.
- A forte atividade antimutagênica e antígenotóxica dos alcalóides β-carbolínicos é em função da sua atividade antioxidante, atuando principalmente na detoxificação de radicais hidroxil.
- Os alcalóides β-carbolínicos atuam sequestrando, principalmente radical hidroxil (OH•).
- A administração sistêmica de harmalina, harmina e harmol facilita a memória de curta duração em camundongos.
- A administração sistêmica de harmalina facilita a memória de longa duração em camundongos.

VII – PERSPECTIVAS

Seria de extrema importância complementar os dados mostrados nesse trabalho para uma melhor compreensão dos mecanismos farmacológicos e toxicológicos dos alcalóides β -carbolínicos, nos seguintes aspectos:

- Verificar o efeito dos alcalóides β -carbolínicos nas mesmas linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas neste estudo utilizando outras condições de tratamento: variando a fase de crescimento e fontes de carbono.
- Verificar o efeito protetor dos alcalóides sobre outros geradores de espécies reativas de oxigênio tanto em levedura como em células de mamífero.
- Medir os níveis de metais, especialmente cobre e ferro, nos mutantes de *S. cerevisiae* utilizados neste estudo, ante e após tratamento com os alcalóides β -carbolínicos e oxidantes, utilizando a técnica de PIXE.
- Quantificar os níveis das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e também da glutathione, antes e depois do tratamento das células com os alcalóides.
- Avaliar os efeitos modulatórios sobre os receptores NMDA glutamatérgicos dos alcalóides β -carbolínicos, utilizando um tratamento em conjunto com a substância MK-801, tentando esclarecer o mecanismo de ação destes alcalóides *in vivo*, utilizando testes neurocomportamentais como reconhecimento de novo objeto, esQUIVA inibitória e estereotíPIA.
- Estudar o efeito dos alcalóides na formação, aquisição e consolidação de memórias aversivas em roedores fazendo-se uso da tarefa de esQUIVA inibitória e tarefas que investiguem memórias espaciais, como o labirinto aquático de Morris ou o labirinto radial de oito braços.

➤ Realizar também o ensaio cometa em células do cérebro, fígado e linfócitos de ratos tratados com alcalóides β -carbolínicos para avaliar as lesões ao DNA *in situ*, já que os alcalóides induziram um aumento significativo na memória nos ensaios de reconhecimento de novo objeto, mostrando-se como promissoras drogas para uso sistêmico.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARONS, D. H., ROSSI, G. V. & ORZECOWSKI, R. F. Cardiovascular actions of three harmala alkaloids: harmine, harmaline and harmalol. *Journal Pharmacology Science*, 66: 1244-1248, 1977.

AGRAWAL, S. K. & FEHLINGS, M. G. Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: role of Na^+ , $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, the $\text{Na}^+\text{-H}^-$ exchanger, and the $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger. *Journal Neuroscience*, 16: 545-552, 1998.

AIRAKSINEN, M. M. & KARI, I. Beta carbolinas, psychoactive compounds in the mammalian body. Part I: Occurrence, origin and metabolism. *Medical Biology*, 59: 21-34, 1981.

ALARCO, A.M., BALAN, I., TALIBI, D., MAINVILLE, N. & RAYMOND, M. AP1-mediated multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae* FLR1 encoding a transporter of the major facilitator superfamily. *The Journal Biological Chemistry*, 272: 19304-19313, 1997.

ALBERTINI, R. J., ANDERSON, D., DOUGLAS, G. R., HAGMAR, K. H., MERLO, F., NATARANJAN, A. T., HANNU, N., SHUKER, D. E. G., TICE, R., WATERS, M. D., & AITIO, A. IPCS guidelines for monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research*, 463:111-173, 2000.

ALLEN, J. R. F. & HOLMESTEDT, B. R. The simple β -carboline alkaloids. *Phytochemistry*, 19: 1573-1582, 1980.

BARKER, S. A., HARRISON, R. E., MONTI, J. A., BROWN, G. B. & CHRISTIAN, S. T. Identification and quantification of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline, 2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline, and 6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline as in vivo constituents of rat brain and adrenal gland. *Biochemical Pharmacology*, 30: 9-17, 1981.

BAUERR, B.E., WOLFGER, H. & KUCHLER, K. Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochemic et Biophysics Acta*, 1461: 217-236.

BIANCHIN M., MELLO E SOUZA T., MEDINA J. & IZQUIERDO I. The amygdala is involved in the modulation of long-term memory, but not working on short-term memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 71:127-131, 1999.

BOEIRA, J.M. Efeito genotóxico dos alcalóides β -carbolínicos harmano e harmina em dois sistemas eucariotos: na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e em fibroblastos de pulmão de hamster chinês. Tese de Doutorado, curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, 2001.

BOEIRA, J. M., SILVA, J., ERDTMANN, B. & HENRIQUES, J. A. P. Genotoxic effects of the alkaloids Harman and Harmine by Comet assay and chromosome aberration test in mammalian cells in vitro, *Pharmacology & Toxicology*, 89: 287-294, 2001.

BOEIRA, J. M., VIANA, A. F., PICADA, J. N. & HENRIQUES, J. A. P. Genotoxic and recombinogenic activities of the two beta-carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutation Research*, 500: 39-48, 2002.

BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals; from electrons to tissues. *Medicina*, 58: 350-356, 1998.

BRADLEY, M.O., BHUYAN, B., FRANCIS, M.C., LANGENBACH, R., PETERSON, A. & HUBERMAN, E. Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: A review and analysis of the literature. *Mutation Research*, 87: 81-142, 1981.

BRENDEL, M., GREY, M., MARIS, A.F., HIETKAMP, J., FESUS, Z., PICH, C.T., DAFRE, L., SCHMIDT, M., ECKARDT-SCHUPP, F. & HENRIQUES, J.A.P. Low

glutathione pools in the original *pso3* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* are responsible for its pleiotropic sensitivity phenotype. *Current Genetics*, 33: 4-9, 1998.

BRENDEL, M. & HENRIQUES, J.A.P. The *pso* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. *Mutation Research*, 489: 79-96, 2001.

BRENNAN, R.J. & SCHIESTL, R.H. Free radicals generated in yeast by the *Salmonella* test negative carcinogens benzenes, urethane, thiourea and auramine O. *Mutation Research*, 403: 65-73, 1998.

BROZMANOVÁ, J., DUDÁS A. & HENRIQUES, J. A. P. Repair of oxidative DNA damage - an important factor reducing cancer risk. *Neoplasma*, 48: 85-93, 2001.

BRUNETON, J. Elementos da Fitoquímica y de Farmacognosia. Editorial Acriba S.A., Zaragoza, 1992.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review Biochemistry*, 58: 79-110, 1989.

CADET, J., DELATOUR, T., GASPARUTTO, D., POUGET, J. P., RAVANAT, J. L. & SAUVAIGO, S. Hydroxyl radicals and DNA base damage, *Mutation Research*, 424: 9-21, 1999.

CAHILL L., MCGAUGH J. & WEINBERGER N. The neurobiology of learning and memory: some reminders to remember. *Trends Neuroscience*, 24:578-581, 2001.

CALLAWAY, J. C., RAYMON, L. P., HEARN, W. L., MCKENNA, D. J., GROB C. S., BRITO, G. S. & MASH, D. C. Quantification of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. *Journal Analytical Toxicology*, 20: 492-497, 1996.

CASALE, J.F. & KOLES, J.E., 1995. Analysis of ayahuasca (Santo Daime [sic]). *Microgram*, 28, 296-299.

CASSARINO, D.S., FALL, C.P., SMITH, T.S. & BENNET, J.P.Jr. Pramipexole reduces reactive oxygen species production in vivo and in vitro and inhibits the mitochondrial permeability transition produced by the parkinsonian neurotoxin methylpyridinium ion. *Journal Neurochemistry*, 71: 295-301, 1998.

CASTELLANO, C., CESTARI, V. & CIAMEI, A. NMDA receptors and learning and memory process. *Current Drug Targets*, 2: 273-283, 2001.

CHO, I.S., SHIN, Y.K. & LEE, C.S. Effects of harmaline and harmalol on the oxidative injuries of hyaluronic acid, lipid and collagen by Fe^{2+} and H_2O_2 . *The Korean Journal of Pharmacology*, 31: 345-353, 1995.

COLEMAN, S.T., EPPING, E.A., STEGGERDA, S.M. & ROWLEY, S.M. Yap1p activates gene transcription in an oxidant-specific fashion. *Molecular and Cell Biology*, 12: 8302-8313, 1999.

COLLINS, A. R., DUSINSKA, M., GEDIK, C. M. & STETINA, R. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspectives*, 104: 465-469, 1996.

COLLINS, A. R., DUTHIE, S. J. & DOBSON, V. L. Direct enzymatic detection of endogenous base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14: 1733-1735, 1993.

COLLINS, A., DUSINSKÁ, M., FRANKLIN, M., SOMOROSVSKÁ, M., PETROVSKÁ, H., DUTHIE, S., FILLION, L., PANAYIOTIDIS, M., RASLOVÁ K. & VAUGHAN N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 30: 139-146, 1997.

COLLINS, M. A. Mammalian alkaloids. In: *The alkaloids chemistry and pharmacology*. Arnold Brossi, Academic Press, New York, v. 21, Cap. 7, p. 329-358, 1983.

COSTA, A. F. *Farmacognosia*. 2a ed. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. V. III, 1993.

CRAPO, J.D., OURY, T., RABOUILLE, C., SLOT, J.W. & CHANG, L.Y. Cooper, zinc superoxide dismutase is primarily cytosolic protein in human cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 89: 10405-10409, 1992.

CRISTEN, S., PETERHANS, E. & STOCKER, R. Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: Possible implication for inflammatory disease. *Proceedings National Academy Science USA*, 87: 2506-2510, 1990.

DE WINDE, J. H., THEVELEIN, J. M. & WINDERRICK, J. Adaptation to nutrient depletion in yeast. In: Hohmann, S., Mager, W. H. *Yeast Stress Responses*. Springer, p.7-52, New York, 1997.

DEARFIELD, K.L., CIMINO, M.C., McCARROLL, N.E., MAUER, I. & VALCOVIC, L.R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Research*, 521: 121-135, 2002.

DEFELIPPIS, M.R., MURTHY, C.P., FARAGGI, M. & KLAPPER, M.H. Pulse radiolytic measurement of redox potential: The tyrosine and tryptophan radical. *Biochemistry*, 28: 4847-4853, 1989.

DELAUNAY, A., ISNARD, A.D. & TOLEDANO, M.B. H₂O₂ sensing through oxidative of the Yap1p transcription factor. *The EMBO Journal*, 19: 5157-5166, 2000.

DEMPLE, B. & HARRISON L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annual Review Biochemistry*, 63: 915-948, 1994.

DEVEAU, A.M., LABROLI, M.A., DIEKHAUS, C.M., BARTHEN, M.T., SMITH, K.S. & MACDONALD, T.L. The synthesis of amino-acid functionalized beta-carbolines as topoisomerases II inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11:1251-1255, 2001.

DIZDAROGLU, M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Biology Medicine*, 10: 225-242, 1991.

DIZDAROGLU, M. Chemistry and measurement of damage to DNA and nucleoproteins. In: Halliwell, B. and Aruoma, O.I. (Eds) *DNA and free Radicals*, Sussex: Ellis Horwood Limited, 1993.

DORMER, U.H., WESTWATER, J., STEPHEN, D.W.S. & JAMIESON, D.J. Oxidant regulation of the *Saccharomyces cerevisiae GSH1* gene. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1576: 23-29, 2002.

DU, W., ALOYO, V.J. & HARVEY, J.H. Harmaline competitively inhibits [³H]MK-801 binding to the NMDA receptor in rabbit brain. *Brain Research*, 770: 26-29, 1997.

DUCROT, P., RABHI, C. & THAL, C. Synthesis of tetrahydro- β -carbolines and studies of the Picet-Spengler reaction. *Tetrahedron*, 56: 2683-2692, 2000.

DUPORTAIL, G. & LAMI, H. Studies of the interaction of the fluorophores harmine and harmaline with calf thymus DNA. *Biochemica et Biophysica Acta*, 402: 20-30, 1975.

ENGELHARDT, J. F. Redox-mediated gene therapies for environmental injury: approaches and concepts. *Antioxidants & Redox Signaling*, 1: 5-27, 1999.

ERGENE, E. & SCHOENER, E. P. Effects of harmaline (1-methyl- β -carboline) on neurons in the nucleus accumbens of the rat. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, 44: 951-957, 1993.

FAIRBAIRN, D. W., OLIVE P. L. & O'NEILL, K. L. The Comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339: 37-59, 1995.

FORMAN, H. J. & THOMAS, M. J. Oxidant Production and bactericidal activity of phagocytes. *Annual Review Physiology*, 48: 669-680, 1986.

FORNAI, F., VAGLINI, F., MAGGIO, R., BONUCCELLI, U. & CORSINI, G.U. Excitatory amino acids and MPTP toxicity. *Advances Neurology*, 69: 167-176, 1996.

FREEDLAND, C. S. & MANSBACH, R. S. Behavioral profile of constituents in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant mixture. *Drug Alcohol Dependence*, 54: 183-194, 1999.

FREITAS, J. M. & MENEGHINI, R. Iron and its sensitive balance in the cell. *Mutation Research*, 475: 153-159, 2001.

FREITAS, J. M., LIBA, A., MENEGHINI, R., VALENTINE, J. S. & GRALLA, E. B. Yeast lacking Cu-Zn superoxide dismutase show altered iron homeostasis. *The Journal Biological Chemistry*, 275: 11645-11649, 2000.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of Experimental Biology*, 201: 1203-1209, 1998.

FUENTES, J. A. & LONGO, V. G. An investigation on the central effects of harmine, harmaline and related β -carbolines. *Neuropharmacology*, 10: 15-23, 1971.

FUGE, E.F. & WERNWE-WASHBOURNE. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Hohmann, S., Mager, W.H. (eds.) *Yeast Stress Responses*, New York: Springer, p. 53-74, 1997.

FUNNAYAMA, Y., NISHIO, K., WAKABAYASHI, K., NAGAO, M., SHIMOI, K., OHIRA, T., HASEGAWA, S. & SAIJO, N. Effects of β - and γ -carboline derivatives on DNA topoisomerases activities. *Mutation Research*, 349: 183-191, 1996.

GANCEDO, J.M. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology Molecular Biology Review*, 62: 334-361, 1998.

GARCIA, J. J., BALLARÍN, E. M., ROBINSON, M. & ALLUÉ, J. L. Protective effect of β -carbolines and other antioxidants on lipid peroxidation due to hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *Neuroscience Letters*, 294: 1-4, 2000.

GLENNON, R. A., DUKAT, M., GRELLA, B., HONG, S. S., COSTANTINO, L., TEITLER, M., SMITH, C., EGAN, C., DAVIS, K. & MATTSON, M. V. Binding of β -carbolines and related agents at serotonin (5-HT₂ and 5-HT_{1A}), dopamine (D₂) and benzodiazepines receptors. *Drug and Alcohol Dependence*, 60: 121-132, 2000.

GLINKA, Y. & YODIM, M.B.H. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *European Journal Pharmacology*, 292: 329-332, 1995.

GOELET P., CASTELLUCI V.F., SCHACHER S. & KANDEL E.R. The long and the short of long-term memory – a molecular framework. *Nature*, 322:419-422, 1986

GRAHAM, D.G. Catecholamine toxicity: a proposal for the molecular pathogenesis of manganese neurotoxicity and Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, 14: 83-95, 1984.

GRALLA, E.B. & KOSMAN, D.J. Molecular genetics of superoxide dismutase in yeast and related fungi. *Advances in Genetics*, 30: 251-319, 1992.

GRALLA, E.B. & VALENTINE, J.S. Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu, Zn, superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *Journal of Bacteriology*, 173: 5918-5920, 1991.

GRANT, C.M., COLLINSON, L.P., ROE, J.H. & DAWES, I.M. Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Molecular Microbiology*, 21: 171-179, 1996a.

GRANT, C.M., MASLVER, F.H. & DAWES, I.W. Stationary-phase induction of GLR1 expression is mediated by the yAP-1 transcriptional regulatory protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 22: 739-746, 1996b.

GRELLA, B., DUKAT, M., YOUNG, R., TEITLER, M., DAVIS K.H., GAUTHIER, C. B. & GLENNON, R.A. Investigation of hallucinogenic and related β -carbolines. *Drug and Alcohol Dependence*, 50: 99-107, 1998.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3a ed. Oxford University Press, New York, 2000.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzimology*, Academic Press, v. 186, p 1-85, New York, 1990.

HARDIMAN, J., CARREL, H.L., ZACHARIAS, D.E. & GLUSKER, J.P. The structure of harman, a comutagen. *Bioorganic Chemistry*, 15 (120): 127-132, 1987.

HASHIMOTO, Y. & YAMADA, Y. Alkaloids biogenesis: molecular aspects. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45: 257-285, 1994.

HASHIMOTO, Y., KAWANISHI, K. & MOTTIYASU, M. Forensic chemistry of alkaloids. *The alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, 32: 40-45, 1988.

HAYASHI, K., NAGAO, M. & SUGIMURA, T. Interaction of norharman and harman with DNA. *Nucleic Acids Research*, 4: 3679-3685 (1977).

HAZEN, M.J. & GUTIÉRREZ-GONZÁLVES, M.G. UV-mediated toxic bioactivity of harmine in the meristematic cells of *Allium cepa*. *Mutagenesis*, 3 (4): 333-337, 1988.

HENRIQUES, A. T., KERBER, V. A. & MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: Simões, C. M. O. *et al. Farmacognosia – Da planta ao medicamento*. 1a ed. Ed. Universidade/UFRGS. Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 1999.

HENRIQUES, J. A. P., DAFRÉ, L. A., PICADA, J. N. & MARIS, A. F. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos, In: Serafini, L. A., Barros, N., Azevedo, J.L. *Biotecnologia na agricultura e na agroindústria*. Editora Agropecuária, Guaíba, 2001.

HENRIQUES, J.A.P., VALSA, J.O. & GOMES, R.A. Utilização de testes com microorganismos para detecção de atividade mutagênicas e/ou potencialmente oncogênicas. In: Pinto, S.O.C. (Ed), *Genética Molecular de Microorganismos*, Manole, São Paulo, 1987.

HERRAIZ, T. & CHAPARRO, C. Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: β -carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 326: 378-386, 2005.

HONECKER, H., COPER, H., FÄHNDRICH, C. & ROMMELSPACHER, H. Identification of tetrahydronorharmine (tetrahydro- β -carboline) in human blood platelets. *Journal of Clinical Chemistry Clinical Biochemistry*, 18: 133-135, 1980.

HUANG, M.R., RIO, A.G., NICOLAS, A. & KOLODNER, R.D. A genome wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes that suppress the accumulation of mutations. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 100 (20): 11529-11534, 2003.

HUSBANDS, S.M., GLENNON, R.A., GORGERAT, S., GOUGH, R., TYACKE, R., NUTT, D. J., LEWIS, J.W. & HUDSON, A. L. β -carboline binding to imidazole receptors. *Drug and Alcohol Dependence*, 64: 203-208, 2001.

HUSSON, H. P. The simple indole alkaloids. In: Brossi, A. *The alkaloid: Chemistry and Pharmacology*. Academic Press Inc, Orlando, v. 26, p. 35-50, 1985.

INOUE, Y., SUGIYAMA, K., IZAWA, S. & KIMURA, A. Molecular identification of glutathione synthetase (GSH2) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1395: 315-320, 1998.

IZAWA, S., INQUE, Y. & KIMURA, A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Biochemical Societies*, p. 73-76, 1995.

IZQUIERDO, I. *Memória*. Artes Medicas Editora, cap. 2, 3, 4, p. 19-57, 2002.

IZQUIERDO I. Different forms of posttraining memory processing, *Behavioral Neural Biology*, 51:171-202, 1989.

IZQUIERDO I., BARROS D.M., IZQUIERDO L., SOUZA M., SOUZA T. & MEDINA J. Memory types differ. *Nature*, 393:635-636, 1998.

IZQUIERDO I. & MCGAUGH J. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behavioral Pharmacology*, 11:517-534, 2000.

IZQUIERDO I., & MEDINA J. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, 68:285-316, 1997.

IZQUIERDO, I., MEDINA, J., VIANNA, M. R. M., IZQUIERDO, L. A. & BARROS, D. M. Separate mechanisms for the short- and long-term memory. *Behavioral Brain Research*, 103: 1-11, 1999.

KIM, D. H., JANG, Y. Y., HAN, E. S. & LEE, C. S. Protective effect of harmaline and harmalol against dopamine and 6-hydroxydopamine- induced oxidative damage of brains

mitochondria and synaptosomes, and viability loss of PC12 cells. *European Journal of Neuroscience*, 13: 1861-1872, 2001.

KIM, H., SABLIN, S.O. & RAMSAY, R.R. Inhibition of monoamine oxidase A by β -carboline derivates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 337: 137-142, 1997.

KIM, H.H., JANG, Y.Y., HAN, E.S. & LEE, C.S. Differential antioxidant effects of ambroxol, rutin, glutathione and harmaline. *Journal of Applied Pharmacology*, 7: 112-120, 2000.

KUGE, S. & JONES, N. YAP1 dependent activation of *TRX2* is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *The EMBO Journal*, 13: 655-664, 1994.

LAVAL, J., JURADO, J., SAPARBAEV, M. & SIDORKINA, O. Antimutagenic role of base-excision repair enzymes upon free radical-induced DNA damage. *Mutation Research*, 402: 94-102, 1998.

LEE, D. H., O'CONNOR, T. R. & PFEIFER, G. P. Oxidative DNA damage induced by cooper and hydrogen peroxide promotes CG-TT tandem mutations at methylated CpG dinucleotides in nucleotide excision repair-deficient cells. *Nucleic Acids Research*, 30: 3566-3573, 1999.

LEE, J.H., CHOI, I.Y., KIL, I.S., KIM, S.Y., YANG, E.S. & PARK, J.W. Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1526: 191-198, 2001.

LEE, S. L., HAN, E. S., JANG, Y. Y., HAN, J. H., HA, H.W. & KIM, D. E. Protective effect of harmalol and harmaline on MPTP neurotoxicity in the mouse and dopamine-induced damage of brain mitochondria and PC12 cell. *Journal of Neurochemistry*, 75: 521-531, 2000.

LIMA, M.N.M., LARANJA, D.C., BROMBERG, E., ROESLER, R. & SCHRÖDER, N. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behavioural Brain Research*, 156: 139-143, 2005.

LIOCHEV, S.I. & FRIDOVICH, I. The role of O₂⁻ in the production of HO₂·: in vitro and in vivo. *Free Radical Biology Medicine*, 16: 29-33, 1994.

LIU, W., CHANG, L.Y., GEUZE, H.J., STROUS, G.J. CRAPO, J.D. & SLOT, J.W. Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver. *Free Radical Biology Medicine*, 23: 408-413, 1993.

LISOWSKI, T. A high copy number of yeast gamma-glutamylcysteine synthetase suppresses a nuclear mutation affecting mitochondrial translation. *Current Genetics*, 23: 408-413, 1993.

LONGO, V. D., GRALLA, E. B. & VALENTINE, J. S. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal Biological Chemistry*, 271(21): 12275-12280, 1996.

LONGO, V.D., LIU, L.L., VALENTINE, J.S. & GRALLA, E.B. Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 365: 131-142, 1999.

MACGAUGH J.L. Memory- A century of consolidation. *Science*, 287:248-251, 2000.

MACGREGOR, J.T., CASCIANO, D. & MÜLLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mutation Research*, 455:3-20, 2000.

MADLE, E., OBE, G., HANSEN, J. & RISTOW, H. Harman and norharmane: induction of sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes in vitro and interaction with isolated DNA. *Mutation Research*, 90: 433-442, 1981.

MARIS, A. F., ASSUMPCÃO, A. L. K., BONATTO, D., BRENDEL, M. & HENRIQUES, J. A. P. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptative stress response and does not depend on functional mitochondria. *Current Genetics*, 39: 137-149, 2001.

MAY, T., GREUBE, A., STRAUSS, S., HEINEKE, D., LEHMANN, J. & ROMMESLPACHER, H. Comparison of the in vitro binding characteristics of the beta-carbolines harmine and norharmine in rat brain and liver and in bovine adrenal medulla. *Naunyn-Schmiedeberg's Archive of Pharmacology*, 349: 308-317, 1994.

MEEHAN, W. J. SPENCER, J. E. P., RANNELS, D. E., WELCH, D. E., KNOBE, E. T. & OSTRANDER, G. K. Hydrogen peroxide induces oxidative DNA damage in rat type II pulmonary epithelial cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 33: 273-278, 1999.

MEERT, T. F. Pharmacological evaluation of alcohol withdraw-induced inhibition of exploratory-behavior and supersensitivity to harmine induced tremor. *Alcohol Alcoholism*, 29: 91-102, 1994.

MEESTER, C. Genotoxic potential of β -carbolines: a review. *Mutation Research*, 3339: 139-153, 1995.

MEISTER, A. Glutathione metabolism. *Methods in Enzimology*, 251: 3-7, 1995.

MERK, O. & SPEIT, G. Detection of cross links with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 33: 167-172, 1999.

MORGAN, B.A., BANKS, G.R., TOONE, W.M., RAITT, D., KUGE, S. & JOHNSTON, L. H. The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 16: 1035-1044, 1997.

MÜLLER, L. & SOFUNI, T. Appropriate levels of cytotoxicity for genotoxicity tests using mammalian cells in vitro. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:202-205, 2000.

MURAKAMI, K. & YOSHINO, M. Inactivation of aconitase in yeast exposed to oxidative stress. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 41: 481-486, 1997.

ODA, Y., NAKAMURA, S. L. & OKI, I. Harman and norharman induce SOS responses and frameshift mutations in bacteria, *Mutation Research*, 208: 39-44, 1998.

OHTAKE, Y. & YABUUCHI, S. Molecular cloning of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 7: 953-961, 1991.

OWEN, R.W., WIMONWATWATEE, T., SPIEGELHALDER, B. & BARTSCH, H. A high performance liquid chromatography method for quantification of hydroxyl radical formation by determination of dihydroxy benzoic acids. *European Journal of Cancer Prevention*, 5: 233-240, 1996.

PARK, T. H., KWON O. S., PARK, S. Y., HAN, E. S. & LEE, C. S. N-methylated β -carbolines protect PC12 cells from cytotoxic effects of MPP⁺ by attenuation of mitochondrial membrane permeability change. *Neuroscience Research*, 46: 349-358, 2003.

PEARSON, A. G. & TURNER, A. J. The formation of beta-carboline alkaloids mediated by serine hydroxymethyltransferase. *FEBS Letters*, 98: 96-98, 1979.

PELLETIER, S. W. The nature and definition of an alkaloid. In: *Alkaloids and Biological Perspectives*. John Wiley, New York, p. 1-31, 1983.

PERES, A. Efeitos dos alcalóides harmina, harmalina, harmol, harmalol, harmano sobre a resposta proliferativa in vitro de linfócitos periféricos humanos estimulados por fitoemaglutina. Dissertação de Mestrado, curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, 1999.

PICADA, J.N. Alcalóides indólicos β -carbolínicos: atividade genotóxica e mutagênica. Dissertação de Mestrado, curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, 1995.

PICADA, J.N. Efeitos da apomorfina e de um produto derivado de sua autooxidação em diferentes modelos biológicos. Tese de Doutorado, curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, 2003.

PICADA, J. N., DA SILVA, K. V. C. L., ERDTMANN, B., HENRIQUES, A. T. & HENRIQUES, J. A. P., Genotoxic effects of structurally related β -carboline alkaloids. *Mutation Research*, 379: 135-149, 1997.

PICADA, J. N., MARIS, A. F., CKLESS, K., SALVADOR, M. BORISOV, N. N. K. & HENRIQUES, J. A. P. Differential mutagenic, antimutagenic and cytotoxic responses induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in bacteria and yeast. *Mutation Research*, 539: 29-41, 2003.

PIMPINELLA, G. & PALMERY, M. Interaction of β -carbolines with central dopaminergic transmission in mice: structure-activity relationships. *Neuroscience Letters*, 189: 121-124, 1995.

POLI, P., BUSCHINI, A., CANDI, A. & ROSSI, C. Bleomycin genotoxicity alteration by glutathione and cytochrome P-450 cellular content in respiratory proficient and deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutagenesis*, 14: 233-238, 199.

PRINGLE, J. R. & HAERTWELL, L.H. The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In: Strathern, J.N., Jones, E.W., Broach, J.R. eds. The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, life cycle and inheritance. Cold Spring Harbor SH Press Company, NY, p. 97-142, 1982.

PRZEDBORSKI, S. & JACKSON-LEWIS, V. Mechanisms of MPTP toxicity. *Movement Disorders*, 13: 35-38, 1998.

PUNGARTNIK, C., PICADA, J. N., BRENDEL, M. B. & HENRIQUES, J. A. P. Further phenotypic characterization of pso mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with respect to DNA repair and responses to oxidative stress. *Genetics Molecular Research*, 179-189, 2002.

QUEVEDO, J., VIANNA, M. R., MARTINS, M. R., BARICHELLO, T., MEDINA, J. H., ROESLER, R. & IZQUIERDO, I. Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. *Behavioral Brain Research*, 15: 339-343, 2004.

RABINOVIC, A.D. & HASTINGS, T.G. Role of endogenous glutathione in the oxidation of dopamine. *Journal Neurochemistry*, 71: 2071-2078, 1998.

RAMPON, C., TANG, Y.P., GOODHOUSE, J., SHIMIZU, E., KYIN, M. & TSIEN, J.Z. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nature Neuroscience* 3, 238-244, 2000.

RANG, H. P., DALE, M. M. & RITTER, J. M. *Farmacologia*. 3a ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1997.

REVERS, L.F., CARDONO, J., BONATTO, D., GREY, M., FELDMANN H., BRENDEL, M. & HENRIQUES, J.A.P. Thermoconditional modulation of the pleiotropic sensitivity phenotype by the *Saccharomyces cerevisiae* PRP19 mutant allele pso4-1. *Nucleic Acids Research*, 30 (22): 4993-5003, 2002.

REYMON, D., VIÑAS, M. H. & CAMACHO, J. J. Steady-state and time-resolved study of the proton-transfer fluorescence of harmine and 2-methyl-harmine in organic solvents. *Journal Photobiology Chemistry*, 120: 85-91, 1999.

RIEDEL, G., PLATT, B. & MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioral Brain Research*, 140: 1-47, 2003.

ROBBERS, J. E., SPEEDIE, M. & TYLER, V. E. *Farmacognosia e Farmacobiotechnologia*. São Paulo. Premier, 1997.

ROESLER, R., SCHRÖDER N., VIANNA, M. R. M., QUEVEDO, J., BROMBERG, E., KAPCZINSKI, F. & FERREIRA, M. B. C. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Research*, 975: 207-213, 2003.

ROESLER, R., VIANNA, M.R.M., PARIS, F. & QUEVEDO, J. Memory-enhancing treatments do not reverse the impairment of inhibitory avoidance retention induced by NMDA receptor blockade. *Neurobiology of Learning and Memory*, 72: 252-58, 1999.

ROMMELSPACHER, H., MAY, T. & SALEWSKI, B. Harman (1-mthyl-beta-carboline) is a natural inhibitor of monoamine oxidase type A in rats. *European Journal Pharmacology*, 252: 51-59, 1994.

ROSA, R.M., FLORES, D.G., APPELT, R., BRAGA, A.L., HENRIQUES, J.A.P. & ROESLER, R.. Facilitation of long-term object recognition memory by pre-training administration of diphenyl diselenide in mice. *Neuroscience Letters*, 341, 217-220, 2003.

ROSS, D. & MOLEDEUS, P. *Antioxidant defense systems and oxidative stress*. 1a ed. Vigo-Pelfrey. Membrane lipid oxidation. Boca Raton, CRC Press p.151-170, 1991.

SASAKI, Y. F., YAMADA, H., SHIMOI, K., KINAE, N., TOMITA, I., MATSUMURA, H., OHTA, T. & SHIRASU, Y. Enhancing effects of heterocyclic amines and β -carbolines on the induction of chromosome aberrations in culture mammalian cells. *Mutation Research*, 269: 79-95, 1992.

SAUVAIGO, S.; SERRES, C.; SIGNORINI, N.; EMONET, N.; RICHARDSON, M. J. & CADET, J. Use of the single-cell gel electrophoresis assay for the immunofluorescent detection of specific DNA damage. *Analytical Biochemistry*, 259: 1-7, 1998.

SCHNELL, N., KREMS, B. & ENTIAN, K.D. The *PARI (YAPI/SQN3)* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a *c-jun* homologue, is involved in oxygen metabolism. *Current Genetics*, 21: 269-273, 1992.

SEN, C. K. & PACKER L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB Journal*, 10: 709-720, 1996.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* 82: 291-295, 1997.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMAN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. *Farmacognosia – Da planta ao medicamento*. 1a ed. Ed. Universidade/UFRGS. Ed. UFSC. Porto Alegre/Floranópolis, 1999.

SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R. & SCHEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cell. *Experimental Cell Research*, 175: 184-191, 1988.

SLOTKIN, T. A. & DIESTEFANO, V. Cardiovascular and respiratory effects of Harmine. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 133: 662-664, 1970.

SPEIT, G. & HARTMANN, A. The Comet assay (single-cell gel test) – A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *DNA Repair Protocols*, 113: 203-212, 1999.

SPLETTSTOESSER, F., BONNET, U., WIRMANN, M., BINGMANN, D. & BUSSELBERG, D. Modulation of voltage-gated channel currents by harmaline and harmine. *British Journal of Pharmacology*, 144: 52-58, 2005.

SRINIVASAN, C., LIBA, A., IMLAY, J.A., VALENTINE, J.S. & GRALLA, E.B. Yeast lacking superoxide dismutase show elevated levels of “free iron” as measured by whole

cell electron paramagnetic resonance. *The Journal Biological Chemistry*, 274: 29187-29192, 2000.

STEBBINS, R. D., MELLER, E., ROSENGARTEN, H., FRIEDHOFF, A. & SILBER, R. Identification of N⁵, N¹⁰-methylene tetrahydrofolate reductase as the enzyme involved in the 5-methyl- tetrahydrofolate dependent formation of a β-carboline derivative of 5-hydroxytryptamine in human platelets. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 173: 673-679, 1976.

STEPHEN, D.W., RIVERS, S.L. & JAMIESON, D.J. The role of the YAP1 and YAP2 genes in the regulation of the adaptative oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 16: 415-423, 1995.

TAIRA, Z., KANSAWAS, S., DOHARA, C., ISHIDA, S., MATSUMOTO, M. & OHSAWA, M. Intercalation of six beta-carboline derivates into DNA. *Japan Journal Toxicology and Environmental Health*, 43: 83-91, 1997.

TERZIYSKA, A., WALTSCHewa, L. & VENKOV, P. A new sensitive test based on east cells for studying environmental pollution. *Environmental Pollution*, 109: 43-52, 2000.

THE MERCK Index. *An Encyclopedia of chemicals drugs, and biologicals*. 11. ed. Rahway, N.J.: Merck & Co., p.727-728, 1989.

THODA, H., TADA, M., SUGAWARA, R. & OIKAWA, A. Actions of amino-β-carbolines on induction of sister-chromatid exchanges. *Mutation Research*, 116: 137-147, 1983.

TICE, R.R., HAYASHI, M., MACGREGOR, J.T., ANDERSON, D., BLAKEY, D., HOLDE, H.E., KIRSCH-VILDERS, M., OLESON Jr, F.B., PACCHIEROTTI, F., PRESTON, R.J., ROMAGNA, R., SHIMADA, H., SUTOU, S. & VANNIER, B. Report

from working group on the in vivo mammalian bone marrow chromosomal aberration test. *Mutation Research*, 312: 305-312, 1994.

TOTSUKA, Y.H., USHIYAMA, H., ISHIHARA, J., SINHA, R., GOTO, S., SUGIMURA, T. & WAKABAYASHI, K. Quantification of the co-mutagenic beta-carboline, norharman and harman, in cigarette smoke condensates and cooked foods. *Cancer Letters*, 143: 139-143, 1999.

TSE, S.Y.H., MAK, I.T. & DICKENS, B.F. Antioxidative properties of harmane and β -carboline alkaloids. *Biochemical Pharmacology*, 42: 459-464, 1991.

UEMURA, T., KANASHIRO, M., HIRAI, K. & MIYAZAKI, N. Isolation, structure and properties of the β -carboline alkaloids formed from 5-hydroxytryptamine by the superoxide anion-generating systems. *Journal Neurochemistry*, 51: 710-717, 1988.

VERT, F.T., SÁNCHEZ, I.Z. & TORRENT, A.O. Acidity constants of harmaline and harmalol in the ground and excited singlet states. *Journal of Photochemistry*, 26: 285-294, 1984.

VIANNA, M. R. M., IZQUIERDO, L. A., BARROS, D. M., WALZ, R., MEDIAN, J. H. & IZQUIERDO, I. Short- and long term memory: differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. *Anal Academia Brasileira Ciência*, 72: 353-364, 2000.

WALZ, R., ROCKEMBACH, I. C., AMARAL, O.B., QUEVEDO, J. & ROESLER, R. MAPK and memory. *Trends Neuroscience*, 22: 495, 1999.

WANG, D., KREUTZER, D. A. & ESSIGMANN, J. M. Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutation Research*, 400: 99-115, 1998.

WATERS, M.D., STACK, H.F. & JACKSON, M.A. Genetics toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. *Mutation Research*, 437:21-49, 1999.

WEMMIE, J.A., SZCYPKA, M.S., THIELE, D.J. & MOYE-ROWLEY, W.S. Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, YCF1. *The Journal Biological Chemistry*, 269: 32592-32597, 1994.

WEISBURGER, J.H. Antimutagenesis and anticarcinogenesis, from the past to the future. *Mutation Research*, 480-481:23-35, 2001.

WOLFBEIS, O.S. & FÜRLINGER, E. The pH dependence of the absorption and fluorescence spectra of harmine and harmol: Drastic differences in the tautomeric equilibria of ground and first excited singlet state. *Zeitschrift für Physikalische Chemie Neue Folge*, 129: 171-183, 1982.

WU A.L. & MOYE-ROWLEY, W.S. *GSH1*, which encodes γ -glutamylcysteine synthetase, is a target gene for Yap-1, transcription regulation. *Molecular Cell Biology*, 14: 5832-5839, 1994.

YAMAUCHI, T. Neuronal Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II- discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: Implication for learning and memory. *Biology Pharmacology Bull*, 28: 1342-1354, 2005.

ZHENG, W., WANG, S., BARNES L.F., GUAN, Y. & LOUIS, E.D. Determination of harmine and harmine in human blood using reverse-phase high performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Analytic Biochemistry*, 279: 125-129, 2000.

ANEXOS

ANEXO I

Curva de sobrevivência das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* EG103 (WT) e mutantes selvagens isogênicas, além das linhagens YPH98 (WT) e a isogênica deficiente no fator de transcrição Yap1p (*yap1Δ*). As células foram tratadas (1×10^7 células/mL) em fase estacionária de crescimento com diferentes doses dos alcalóides β -carbólicos, em PBS por 1 hora a 30°C.

(A)

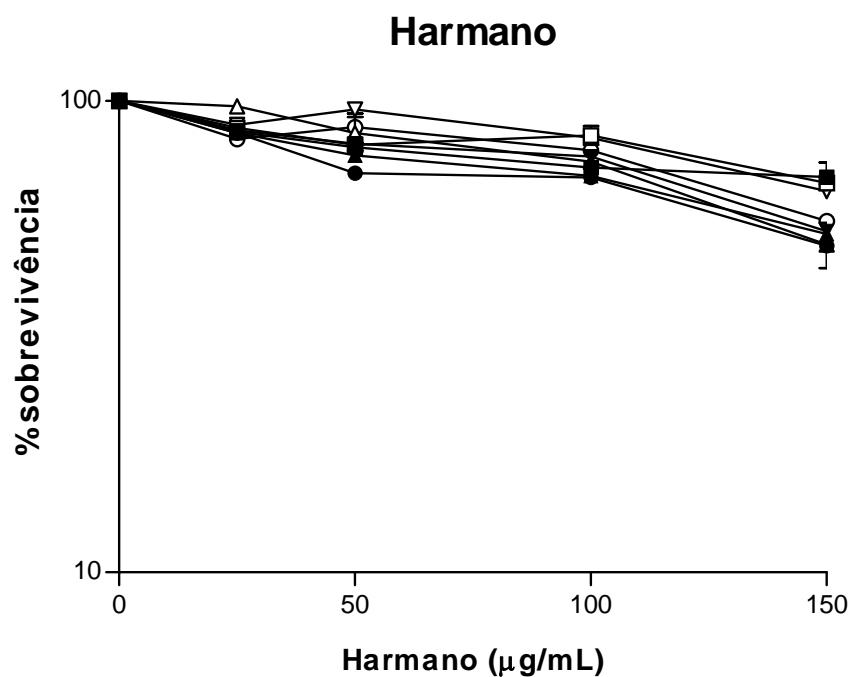
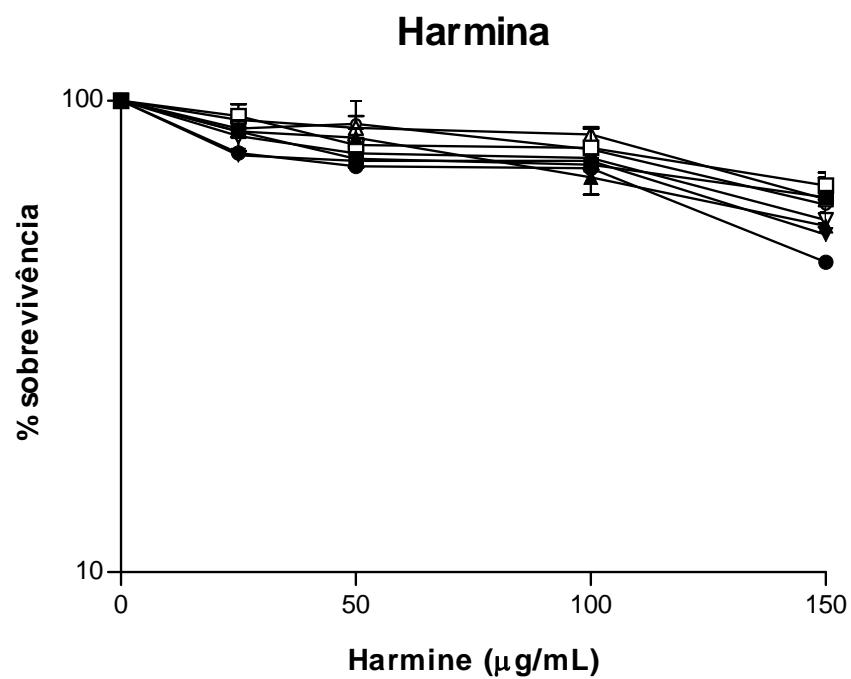


Figura 1. (Continuação)

(B)



(C)

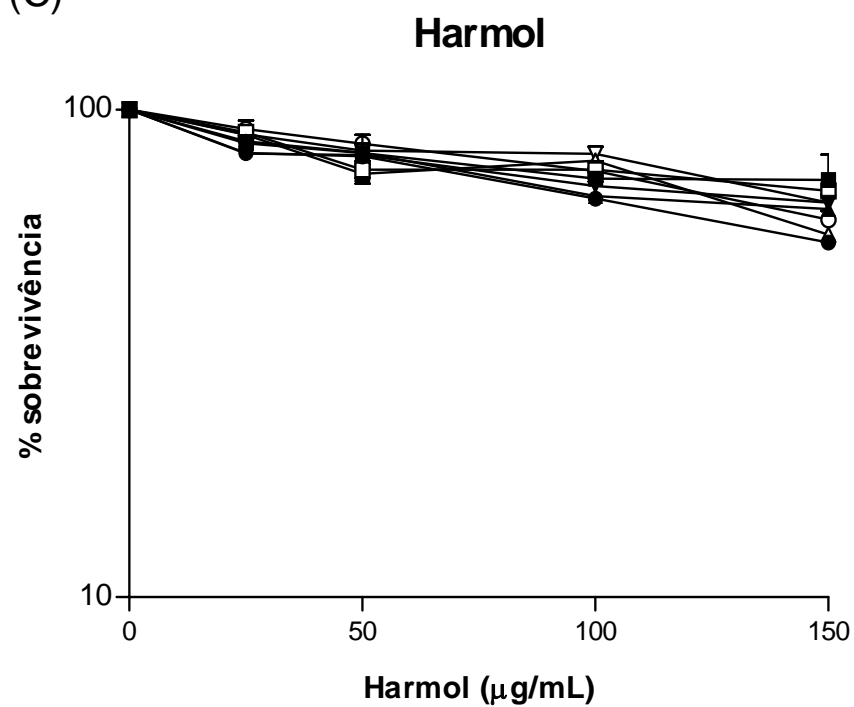


Figura 1. (Continuação)

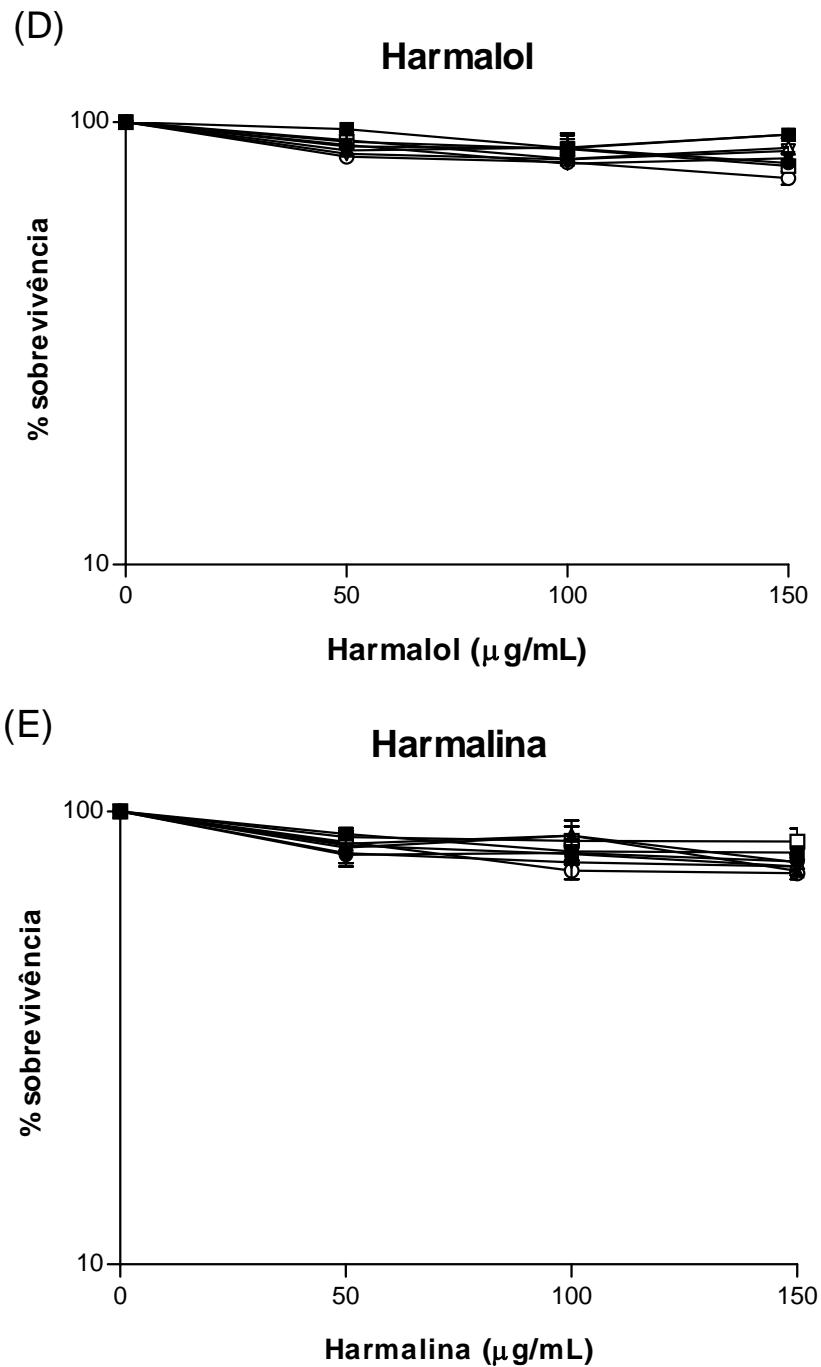


Figura 1. Sensibilidade de *S. cerevisiae* em fase estacionária de crescimento aos alcalóides β -carbólicos harmano (A), harmina (B), harmol (C), harmalol (D) e harmalina. (■) SOD (WT); (▲) *sod1* Δ ; (▼) *sod2* Δ ; (●) *sod1* Δ *sod2* Δ ; (□) *ctt1* Δ ; (Δ) *sod1**ctt1* Δ ; (▽) YPH98 (WT); (○) *yap1* Δ . Células foram diluídas em salina e convenientemente plaqueadas. Média e desvio padrão três ou mais experimentos independentes.

Ensaio de mutagênese com a linhagem N123 de *Saccharomyces cerevisiae*, em fase estacionária de crescimento. Para o tratamento, as células foram crescidas até fase estacionária e lavadas duas vezes em salina. As células foram tratadas em uma concentração de 2×10^8 células/mL em PBS por 2 horas a 30°C, com doses crescentes dos alcalóides. Após o tratamento, para a mutagênese: as células foram plaqueadas em placas SC-CAN na mesma concentração do tratamento (2×10^8 células/mL); para a sobrevivência as células foram convenientemente diluídas e plaqueadas em placas SC. Segue abaixo o resultado obtido.

Tabela 1. Indução de mutação na linhagem haplóide N123 de *Saccharomyces cerevisiae* após tratamento com harmano, harmina, harmol, harmalina e harmalol em fase estacionária de crescimento em PBS.

Agente	Tratamento	Sobrevivência (%)	Can/10 ⁷ sobreviventes ^a
CN ^b	0	100	1,05 + 0,57 ^d
4NQO ^c	0.5 µg/mL	33,6	61,17 ± 6,342***
Harmano	10 µg/mL	88,56	2,54 ± 0,02
	25 µg/mL	88,25	1,98 ± 1,03
	50 µg/mL	74,18	2,55 ± 0,42
Harmina	10 µg/mL	96,55	1,71 ± 0,45
	25 µg/mL	88,18	1,39 ± 0,52
	50 µg/mL	73,4	2,77 ± 0,36
Harmol	10 µg/mL	88,30	1,90 ± 0,59
	25 µg/mL	86,56	2,08 ± 0,42
	50 µg/mL	78,9	2,23 ± 0,43
Harmalol	10 µg/mL	92,26	1,25 ± 0,75
	25 µg/mL	91,49	1,97 ± 0,28
	50 µg/mL	86,23	2,03 ± 0,24
	75 µg/mL	93,52	2,04 ± 0,22
Harmalina	10 µg/mL	96,63	1,55 ± 0,29
	25 µg/mL	97	1,65 ± 0,98
	50 µg/mL	95,96	2,03 ± 0,30
	75 µg/mL	88,39	2,39 ± 0,34

^a Revertentes locus-específico; ^b Controle negativo; ^c Controle positivo (óxido de 4-nitroquinolina); ^d Média e desvio padrão de três experimentos independentes; ***Dados significantes em relação ao controle negativo (solvente) com $P < 0.001$ / One-way ANOVA-Tukey's Multiple Comparison Test.

O **ensaio cometa** foi realizado em células de pulmão de hamster chinês (V79). As células foram cultivadas em condições padrão, conforme descritas anteriormente (Capítulo I). O teste cometa foi realizado como descrito por *Singh et al.* (1988) com pequenas modificações (HARTMAN & SPEIT, 1997). As células (2×10^5 cel/mL) foram tratadas por 2 horas com diferentes doses dos alcalóides a 36°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Segue abaixo os resultados obtidos.

Tabela 2. Efeito dos alcalóides harmano, harmina, harmol, harmalol e harmalina em células V79 tratadas por duas horas e, avaliadas pelo Teste Cometa.

Substância	Tratamento	Índice de Dano ^c	Frequência de Dano (%) ^c
NC ^a		46,00 ± 4,00	49,00 ± 2,00
MMS ^b	4.0x10 ⁻⁵ M	227,00 ± 4,35***	86,00 ± 9,84***
Harmano	10 µg/mL	80,00 ± 8,93	41,33 ± 3,05
	20 µg/mL	92,33 ± 3,79	58,00 ± 3,00
	40 µg/mL	102,71 ± 6,19*	69,66 ± 1,57*
Harmina	10 µg/mL	84,00 ± 16,28	54,33 ± 4,61
	20 µg/mL	91,01 ± 0,73	65,66 ± 6,42
	40 µg/mL	103,2 ± 4,58*	71,64 ± 1,82*
Harmol	10 µg/mL	82,68 ± 5,85	54,33 ± 3,53
	20 µg/mL	80,02 ± 13,89	56,00 ± 2,00
	40 µg/mL	93,33 ± 7,57*	58,30 ± 14,97
	80 µg/mL	150,00 ± 12,76***	72,00 ± 5,29**

Tabela 2. (continuação)

Substância	Tratamento	Índice de Dano ^c	Frequência de Dano (%) ^c
Harmalol	10 µg/mL	55,38 ± 6,65	50,00 ± 4,35
	20 µg/mL	63,05 ± 2,83	53,65 ± 8,62
	40 µg/mL	58,66 ± 4,60	56,35 ± 7,57
	80 µg/mL	62,33 ± 15,53	48,66 ± 10,96
	100 µg/mL	86,00 ± 15,71 *	52,66 ± 10,59
	200 µg/mL	106,33 ± 16,28**	69,66 ± 1,15*
Harmalina	10 µg/mL	49,66 ± 20,42	35,66 ± 10,96
	20 µg/mL	66,34 ± 11,93	50,60 ± 7,8
	40 µg/mL	80,67 ± 10,42	57,00 ± 2,3
	80 µg/mL	79,00 ± 13,51	52,62 ± 4,72
	100 µg/mL	96,00 ± 20,66**	54,00 ± 7,20
	200 µg/mL	106,66 ± 10,70**	68,00 ± 1,00*

^a Controle negativo (solvente); ^b controle positivo (metil metano sulfonato); ^c média e desvio padrão obtidos da análise de 100 células por tratamento – total de 3 experimentos para cada substância * dados significantes em relação ao controle negativo (solvente) com $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ /one-way Tukey's Multiple Comparison Test.

ANEXO 2**CARTA EDITOR PERIÓDICO**

Dear Dr. Boeira,

Your submission entitled "Beta-carboline alkaloids induce facilitation of long- and short-term object recognition memory in mice" has been received by Life Sciences

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial Systems as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/lfs/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Life Sciences

ANEXO 3**CURRÍCULUM VITAE****MOURA, D.J.****1. DADOS PESSOAIS**

Nome: Dinara Jaqueline Moura

Local e data de nascimento: Santo Augusto, RS, Brasil, 20 de outubro de 1979

Endereço Profissional: Avenida Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43422, Sala 210

Telefone Profissional: 51 33167602

E-mail: dinja@cbiot.ufrgs.br

2. FORMAÇÃO

1998 – 2002 Graduação em Farmácia pela Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ.

3. ESTÁGIOS

2003 – 2004 Estágio voluntário – Laboratório de Radiobiologia Molecular,
Departamento de Biofísica, UFRGS
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jenifer Saffi

2004 – 2006 Apoio Técnico de Laboratório – Laboratório de Radiobiologia
Departamento de Biofísica, UFRGS
Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques
Bolsa: CNPq

4. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

CAVALCANTI, B.C., COSTA-LOTUFO, L.V., MORAES, M.O., BURBANO, R.R., SILVEIRA, E.R., CUNHA, K.M.A., RAO, V.S.N., MOURA, D.J., ROSA, R.M., HENRIQUES, J.A.P., C. PESSOA. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 388–392, 2006.

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

CAVALCANTI, B.C., MOURA, D.J., ROSA, R.M., SILVEIRA, E.R., RAO, V.S.N., MORAES, M.O., SILVA, J., HENRIQUES, J.A.P., PESSOA, C., LOTUFO, L.V.C. Efeito genotóxico do ácido kaurenóico obtido de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae) em células V79. In: VII Congresso Brasileiro De Mutagênese, Carcinogênese E Teratogênese Ambiental, 2005, Natal - RN. *Genetics and Molecular Biology*, 28, p. 253, 2005.

JIMENEZ, P.C., VASCONCELLOS, M.C., CAVALCANTI, B.C., ARAÚJO, E.C.C., LIMA, M.A.S., MOURA, D.J., ROSA, R.M., MORAES, M.O., PESSOA, C., LOTUFO, L.V.C., SILVA, J. HENRIQUES, J.A.P. Efeito genotóxico de diterpenos abietanos obtidos de *Hyptis martiusii* Benth. In: VII Congresso Brasileiro De Mutagênese, Carcinogênese E Teratogênese Ambiental, 2005, Natal - RN. *Genetic and Molecular Biology*, 28, p. 265, 2005.

MACEDO, B.C., MOURA, D.J., HENRIQUES, J.A.P., SAFFI, J. Mutagenic effect of harmol, harmaline and harmalol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: VII Congresso Brasileiro De Mutagênese, Carcinogênese E Teratogênese Ambiental, 2005, Natal - RN. *Genetics and Molecular Biology*, 28, p. 75, 2005.

MOURA, D.J., HENRIQUES, J.A.P., SAFFI, J. Antioxidative action of beta-carbolines alkaloids in *Saccharomyces cerevisiae*. In: XXXIII Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Bioquímica e Biologia Molecular, 2004, Caxambu - MG. Livro de Resumos XXXIII Reunião Anual da SBBq - Programa e Resumos. 2004.

MOURA, D.J., HENRIQUES, J.A.P., SAFFI, J. Atividade dos alcalóides beta-carbolínicos sobre o estresse oxidativo em diferentes linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. In: XXIV Reunião De Genética De Microrganismos, 2004, Gramado - RS. Livro de Resumos da XXIV Reunião de Genética de Microrganismos. 2004. p. 255-255.

MOURA, D.J., MACEDO, B.C., HENRIQUES, J.A.P., SAFFI, J. Genotoxic effects of beta-carbolines and structure-activity relationship using comet assay. In: Porto Alegre -

RS. VII Reunião Anual do PPGBCM - Livro de Resumos VII Reunião Anual do PPGBCM, 2005.

MOURA, D.J., MACEDO, B.C., SZTROMOWSKI, K., HENRIQUES, J.A.P., SAFFI, J. Genotoxic effects of beta-carbolines and relationship structures activity using comet assay. In: VII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2005, Natal - RN. *Genetics and Molecular Biology*, 28, p. 74, 2005.

PELEGRINI, A.L., MOURA, D.J., ROSA, R.M., SAFFI, J., HENRIQUES, J.A.P., LENZ, G. Silenciamento da Quinase NEK1 aumenta dando ao DNA em células HEK293T. In: 51° Congresso Brasileiro de Genética, 2005, Águas de Lindóia. Programação e Resumos do 51° Congresso Brasileiro de Genética, 2005.

ROSA, R.M., MOURA, D.J., PICADA, J.N., SAFFI, J., HENRIQUES, J.A.P. Efeito pró-oxidante do diseleneto de difenila em cultura de fibroblasto de hamster chinês. In: VII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2005, Natal - RN. *Genetics and Molecular Biology*, 28, p. 72, 2005.

VASCONCELLOS, M.C., CAVALCANTI, B.C., FONSECA, M.A., MOURA, D.J., LEMOS, T.G.L., ROSA, R.M., MORAES, M.O., LOTUFO, L.V.C., HENRIQUES, J.A.P., PESSOA, C. Avaliação das atividades genotóxica e oxidativa da biflorina uma orto-naftoquinona obtida da *Capraria biflora*. In: VII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2005, Natal - RN. *Genetics and Molecular Biology*, 28, p. 264. 2005.

VIEIRA, D.L., RORIG, C., MOURA, D.J., ALBA, M.P., HENRIQUES, J.A.P., BOEIRA, J.M. Alkaline comet assay in livers cells of mice treated with psychotropic beta-carboline alkaloids harman, harmine and harmaline. In: VII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2005, Natal - RN. *Genetics and Molecular Biology*, 28, p. 91, 2005.