



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de la actividad genotóxica y  
citostática de los alcaloides beta carbolinos  
harmino y harmalino en dos ensayos de  
células humanas *in vitro*.

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A :

JUDITH JIMÉNEZ

**DIRECTORA DE TESIS:** Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE DE 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **RECONOCIMIENTOS**

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Genética del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección de la Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz.

Para la realización de esta tesis conté con el apoyo económico otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) durante el periodo de febrero de 2005 a junio de 2006 mediante la beca con número de registro 194919.

El comité tutorial que asesoró esta tesis estuvo conformado por:

Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz

Dr. Javier Espinosa Aguirre

Dra. Sandra Gómez Arroyo

M en C. Leticia Riverón Negrete

Dra. Sara Frías Vázquez

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi mamá que forma parte fundamental de mi vida y mi formación como persona.

A mis hermanos Sara y César por su apoyo incondicional en todo momento.

Y de manera muy especial a todos aquellos que forman parte de una etapa de mi vida, que se encuentran dentro del laboratorio en donde desarrolle este proyecto de manera especial a la Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz por su invaluable apoyo, tenacidad y paciencia en los momentos difíciles y finalmente por su dedicación en la realización de la tesis,

A la M. en C. Lupita por su tiempo, disposición y asesoría técnica.

A la Dra. América por amenizar la estancia en el laboratorio.

Al Dr. Javier Espinosa Aguirre por sus valiosos comentarios para la realización de este proyecto y la culminación de este en la presente tesis.

A la Dra. Sandra Gómez Arroyo por su valiosa objetividad en la realización y revisión de la tesis, así como su gran disposición en todo momento para la realización de la misma.

Al Laboratorio de Oncología Experimental por las facilidades otorgadas para la realización de una parte de la tesis y en especial a la M. en C. Leticia Riverón Negrete por su valiosa asesoría y atinados comentarios.

A la Dra. Sara Frías Vázquez por su objetividad y cautelosa revisión de la tesis.

## **ÍNDICE**

Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción	4
Los beta-carbolinos	4
Efectos fisiológicos de los beta-carbolinos	8
Efectos genotóxicos de los beta-carbolinos	9
Bioensayos	11
Justificación	13
Objetivo general	13
Objetivos particulares	14
2. Materiales y Métodos	15
Compuestos químicos	15
Ensayo de micronúcleos	15
Diseño Experimental	16
Ensayo de viabilidad	20
Ensayo de crecimiento de colonias	21
3. Resultados	24
4. Discusión	27
5. Conclusiones	32
Referencias	33
Tablas y Gráficas	46
Anexo 1. Cuestionario y carta de consentimiento	55
Anexo 2. Validación del ensayo de micronúcleos	57
Anexo 3. Características de las líneas celulares empleadas	59

## RESUMEN

Los alcaloides beta carbolinos son productos naturales que se encuentran en diversas plantas que están ampliamente distribuidas. También se encuentran en diversas bebidas alcohólicas, alimentos bien cocinados y en el humo del tabaco. Se ha reportado que inducen diversos efectos genotóxicos, tanto en procariontes como en eucariontes, los que se han atribuido a su habilidad para intercalarse en el DNA lo que conduce a alteraciones en la fidelidad de la replicación del DNA o bien pueden influir en actividades enzimáticas o procesos de reparación del DNA.

El propósito de esta investigación fue el de comparar la actividad genotóxica y citotóxica inducida por dos alcaloides  $\beta$ -carbolinos: harmino y harmalino en células humanas in vitro. Los ensayos que se emplearon para evaluar la probable genotoxicidad fue el de micronúcleos obtenidos a partir del cultivo de linfocitos; y para determinar la citotoxicidad los ensayos de viabilidad y crecimiento de colonias en líneas celulares transformadas. Para el ensayo de micronúcleos se probaron cuatro concentraciones diferentes, se corrieron de forma concurrente un testigo negativo (solvente) y un testigo positivo (mitomicina C). Se analizaron un total de 5,500 células por cada experimento. Los resultados muestran que en las concentraciones intermedias así como en la más alta de los dos beta carbolinos estudiados la sobrevivencia celular se redujo considerablemente. El harmino mostró inducir tanto células apoptóticas como necróticas en los dos géneros en las concentraciones de 20 y 40  $\mu$ M por lo que este compuesto mostró ser altamente citotóxico. El índice de proliferación celular varió entre 1.75 y 1.97 para el harmalino; y entre 1 y 2 para el harmino lo que corrobora la citotoxicidad inducida por el beta carbolino aromático completo.

Los resultados del ensayo de viabilidad manifiestan que el harmino redujo la viabilidad de los fibroblastos (línea celular control) y de la línea C33 (carcinoma cervical humano) mientras que el harmalino redujo la viabilidad de todas las líneas celulares estudiadas, por lo cual este beta carbolino resultó ser inespecífico. En el ensayo de crecimiento de colonias la respuesta obtenida en

el porcentaje de inhibición fue directamente proporcional a la dosis y el mayor efecto inhibitorio se obtuvo en la línea transformada SW480.

Se propone que el harmino al presentar un marcado efecto citotóxico y citostático podría ser un buen candidato para ser utilizado en la terapia del cáncer de colón en un futuro, por lo que se recomienda realizar los ensayos pertinentes para evaluar con más detalle este efecto.

## **Abstract**

$\beta$ -carboline alkaloids are natural products widely distributed in plants and also found in alcoholic beverages, well-cooked foods and tobacco smoke. Various authors have reported genotoxic activities of several carboline alkaloids in prokaryotic and eukaryotic cells that have attributed to their abilities to intercalate into DNA.

The objective of the present study was compare the genotoxic and cytotoxic activities induced for two  $\beta$ -carbolines harmine and harmaline in two in vitro human cell assays: the cytochalasin-B blocked micronucleus (CBMN) assay and the viability/colony formation assay with four different human cultured cell lines: the non transformed fibroblast FB-CCD18Lu and the transformed HeLa, C33A and SW480 cell lines. In CBMN assay four concentrations of the compounds were tested, as well as, the negative control (solvent) and the positive control (mitomycin C). Neither alkaloid was able to induce micronuclei above that of negative control levels; although, harmine at the highest concentrations assayed induced apoptotic as well necrotic cells. Harmine produced a good viability of the cell lines assayed (control and tumor) while harmaline significantly reduced the viability of transformed and no-transformed cell lines in a dose-dependent manner. Harmine displayed a dose-dependent inhibitory effect on cell proliferation against all human carcinoma cells, but the SW480 transformed cell line showed a higher sensitivity. These results suggested that harmine was identified as a useful inhibitor of tumor development.



## Introducción

### Los beta-carbolinos

Los alcaloides son productos secundarios de las plantas que se sintetizan a partir de los aminoácidos esenciales. Los  $\beta$ -carbolinos son alcaloides que derivan del grupo indol, su estructura química está relacionada con las aminas aromáticas heterocíclicas (tienen una estructura similar) y pueden sintetizarse en el laboratorio a partir del L-triptófano. El triptófano es un precursor del neurotransmisor serotonina por lo cual es un aminoácido muy importante para el sistema nervioso central ([www.ansci.cornell.edu](http://www.ansci.cornell.edu)). Los beta-carbolinos se encuentran representados en al menos 126 especies de plantas, algunas de ellas conocidas comúnmente como maracujás, tales como: *Peganum harmala*, (Zygophillaceae) *Pasiflora incarnata*, (Passifloraceae) *Banisteria caapi* (Lewis, 1998) y en algunas *Banisteriopsis spp*, *Tetrapteris spp*, (Malpighiaceae) *Virola spp* (Myristicaceae) y *Anadenanthera spp* (Leguminosae) (Hashimoto *et al.*1988; Bruneton, 1992).

*Peganum harmala* pertenece a la familia *Zygophillaceae*, son plantas herbáceas, perennes, de raíces leñosas, ramas profundas, alcanzan una altura de 90 centímetros, su tallo mide alrededor de 30 centímetros. Pubescentes o glabras poseen un follaje denso, hojas alternadas y carnosas con margen irregular pinatfinadas con lóbulos lineares, flores solitarias con pedicelos, de 4-5 sépalos márgenes enteros o pinatfinadas; 4-5 pétalos blancos o amarillos; estambres de 12-15 filamentos lineares; pistilos lobulados de 2 a 4 (Fig. 1). Se encuentra en regiones áridas. Las semillas tienen un color rojo turquesa. Comúnmente se conoce como harmal o ruda africana. En México se conoce la especie *Peganum mexicanum* (limoncillo o garbancillo) que es nativa del estado de Chihuahua y no es tóxica (Burrow y Tyrl, 2001).



Figura 1. *Peganum harmala*.

Los compuestos farmacológicamente activos de *Peganum harmala* son los alcaloides beta-carbolinos, tales como el harmino, el harmalino, el harmalol y el harmano, los cuales se han encontrado específicamente en las semillas (Fig. 2) y en las raíces (Kamel *et al.*, 1970).



Figura 2. Semillas de *Peganum harmala*.

Diversos estudios reportan que los alcaloides  $\beta$ -carbolinos como el harmano, harmino y harmalino se encuentran comúnmente en una gran variedad de productos alimenticios como: el trigo, arroz, maíz, cebada, semillas de soya, centeno, uvas, hongos y vinagre; así como en las plantas utilizadas para la elaboración de bebidas (vino, cerveza, whisky, brandy y sake) (Adachi *et al.*, 1991) y en la elaboración fabricación del tabaco y de los cigarros (Poindexter y Carpenter, 1962). Estas sustancias también se han encontrado en tejidos endógenos de animales y han sido aislados de la carne de res y de

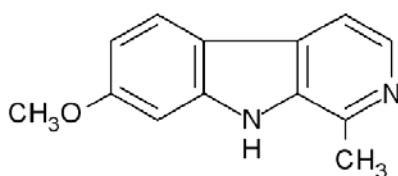
las sardinas (Adachi *et al.*, 1991). El harmino se ha encontrado en el plasma humano después de la ingestión de “ayahuasca”, una bebida que es utilizada con propósitos religiosos en Brasil (Callaway *et al.*, 1996).

Los extractos de *P. harmala* se han empleado desde hace 2000 años en China y actualmente se usan de manera cotidiana al noroeste del país como una potente medicina tradicional por su efecto antitumoral y para el tratamiento de la malaria (Qi *et al.*, 2004; Xie y Luo 1998; Duan *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1995). Los aborígenes de África del Sur los usan para aliviar el dolor y la hiperquinesia y para el tratamiento tradicional del cáncer del aparato digestivo (Johnson, 1982). Estudios químicos y farmacológicos realizados recientemente en China demostraron que el harmino, aislado de *Peganum harmala* inhibe el crecimiento y la proliferación en células tumorales y exhibe una fuerte toxicidad contra diferentes líneas celulares tumorales humanas (Ishida *et al.*, 1999). En Irán el extracto de las semillas de *Peganum harmala* se utiliza como una preparación etnobotánica para el tratamiento de las neoplasias (Sobhani *et al.*, 2002).

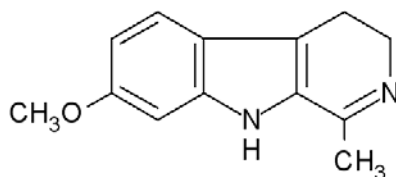
En los últimos años los alcaloides  $\beta$ -carbolinos han tenido una gran atención debido a sus propiedades bioquímicas como agentes neuroreguladores (Airaksinen y Kari, 1981) y a su amplia actividad farmacológica y bioquímica incluyendo la inhibición de la enzima monoamina-oxidasa (MAO) y los citocromos P450 (Kim *et al.*, 1997; Fuller *et al.*, 1986; Rommelspacher *et al.*, 1994 y Tweedie *et al.*, 1988). Otras de sus propiedades son antiespasmódicos, sedativos (Boeira *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 1988), ligandos de receptores a imidazoles (Hudson *et al.*, 1999), moduladores de la presión arterial (Coddington, 1983), ansiolíticos (Barbaccia *et al.*, 1986); tienen actividad antimicrobiana (Aqeel *et al.*, 1992) se utilizan en la prevención de la leishmaniasis (Di Giorgio *et al.*, 2004) y como ya se mencionó poseen actividad antitumoral (Qi *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2005). *Peganum harmala* se utiliza de manera tradicional como agente abortivo en Medio Oriente y en el Norte de África. Se sugiere que estas propiedades pueden estar relacionadas con la formación de complejos moleculares entre los  $\beta$ -carbolinos y el DNA o con otros sustratos biológicos. Se ha reportado que los  $\beta$ -carbolinos interactúan con

el DNA mediante intercalación además sus átomos de nitrógeno pirídnicos y pirrólicos son sitios donadores y aceptores, respectivamente para las interacciones con puentes de hidrogeno (Muñoz *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2000).

Los beta-carbolinos más estudiados en los laboratorios de investigación, y que corresponden a más del 60% de los alcaloides que se encuentran en los extractos de las semillas, son el harmino y el harmalino (Fig. 3). Estos compuestos se ha demostrado que son alucinógenos en los seres humanos (McGeer *et al.*, 1978).



**Harmino** (7-metoxi-1-metil-9H-pirido [3,4-b]indole)



**Harmalino** (4,3-dihidro-7-metoxi-1-metil 9H-pirido[3,4-b]indole)

Figura 3. Estructuras químicas de dos beta-carbolinos.

Se conocen varios niveles en los que podrían estar actuando los alcaloides beta-carbolinos desde los efectos fisiológicos y bioquímicos hasta los genotóxicos.

### **Efectos fisiológicos de los beta-carbolinos**

El harmino y harmalino son alucinógenos en los seres humanos (McGeer *et al.*, 1978). El mecanismo propuesto es a través de la inhibición de la monoaminoxidasa (MAO) lo cual posiblemente aumente la actividad

dopaminérgica y serotoninérgica en el sistema nervioso central. Sin embargo, el intrincado mecanismo del harmalino está relacionado con la acción de éste sobre las neuronas olivares inferiores. Estas neuronas son parte del sistema extrapiramidal, localizadas en la región baja medular cercana a las células piramidales, conectadas con el cerebelo vía fibras olivo-cerebelares. Estas células ascienden a través del cordón espinal interaccionando con los núcleos rojos del cerebelo y con el ganglio basal de las células de Purkinje del cerebelo. El efecto total se produce sobre la capacidad de las neuronas para coordinar los movimientos lo que se traduce en un incremento en el tono muscular y por lo tanto origina rigidez de las extremidades. El harmalino causa un temblor generalizado (Lamarre y Mercier 1971; Llinás y Volkind 1973; Knowles y Phillips 1980). Los efectos olivares son dos: la hiperpolarización de neuronas y la facilidad para disminuir la conductancia del umbral (Llinás, 1991). Esto sugiere que el harmalino causa degeneración selectiva de las células de Purkinje específicamente de las proyecciones de las fibras olivo-cerebelares mediante la excitación liberando aminoácidos y receptores de NMDA (O'hearn y Molliver 1993; Du y Harvey 1997). Sjolund y colaboradores en 1977 sugirieron que el harmalino actúa presinápticamente como un inhibidor antagonista de la liberación de serotonina en células olivares inferiores. Se ha propuesto que los sistemas GABAérgicos y olivares son los mediadores de la inducción del temblor debido al harmalino. (Headley *et al.*, 1976; Robertson, 1980; Sotelo *et al.*, 1986). También se ha demostrado que el harmalino puede desplazar la unión de los receptores de benzodiazepinas en el cerebro (Burkard *et al.*, 1985). La sustitución de un H en el C7 (harmano), por un grupo metoxilo (harmino), incrementa el potencial inhibitorio contra la MAO alrededor de 10 veces, lo cual incrementa los niveles de la N-acetiltransferasa. Para el caso del harmalino que tiene un grupo metoxilo en la posición C7 se encontró que es el inhibidor más potente, sin embargo cuando el H en la posición C7 es sustituido por un grupo OH (harmalol), la afinidad disminuye a una cuarta parte (Fernández de Arriba *et al.*, 1994).

## Efectos genotóxicos de los beta-carbolinos

Los beta-carbolinos han mostrado ser capaces de intercalarse en el DNA (de Meester, 1995; Duportail, 1981; Taira *et al.*, 1997; Balón *et al.*, 1999), lo que conduce a una alteración de la fidelidad en la replicación del DNA o bien pueden influir en actividades enzimáticas o procesos de reparación del DNA (Funayama *et al.*, 1996; Balón *et al.*, 1999). Se ha demostrado que también forman aductos con el DNA (Yamashita *et al.*, 1988; Wakabayashi *et al.*, 1997). La única diferencia estructural entre el harmino y el harmalino es un grupo metoxil en el carbono 7 del harmino. Su estructura aromática tricíclica facilita su habilidad para intercalarse en la hebra de DNA (Duportail, 1981; Taira *et al.*, 1997; Balón *et al.*, 1999) se cree que el grupo metoxilo facilita esta intercalación; el harmino mostró inducir entrecruzamientos y conversión génica en *Saccharomyces cerevisiae* (Taira *et al.*, 1997).

Se han reportado tanto efectos mutagénicos como antimutagénicos inducidos por los alcaloides beta carbolinos en procariontes y eucariontes (Boeira *et al.*, 2002). Induce mutaciones de corrimiento de marco de lectura en *Salmonella typhimurium* TA97 y TA98 (Wehner *et al.*, 1979; Picada *et al.*, 1997) y en *Escherichia coli* KMBL3835 (Oda y Nakamura, 1988). Se ha demostrado que el harmalino es un mutágeno de acción directa en *Salmonella tiphymurium* TA 100 después del tratamiento con nitritos (Ochiai *et al.*, 1986).

El harmino induce aberraciones cromosómicas en células de ovario de criceto chino (CHO) de forma sinérgica después del tratamiento con luz ultravioleta (UV) y mitomicina C (MMC) en presencia de la fracción S9 (Sasaki *et al.*, 1992). También incrementa la frecuencia de micronúcleos y el intercambio de cromátidas hermanas después de irradiar con UV células meristemáticas de *Allium cepa* (Hazen y Gutiérrez-González, 1988), e induce MN y aberraciones cromosómicas en eritrocitos provenientes de médula ósea de ratón (Mavournin *et al.*, 1990; Tice *et al.*, 1994). En el ensayo de aberraciones cromosómicas con células V79 de criceto chino el harmano y el harmino, en ausencia de un sistema de activación metabólica, indujeron algunos rompimientos aunque no se encontró una respuesta dependiente de la

dos; asimismo indujeron lesiones en el DNA medidas a través del ensayo cometa (Boeira *et al.*, 2001). En un estudio de relación entre la estructura química y la actividad antimutagénica se encontró que el harmano, el harmino, el norharmano y el harmalino reducen la mutagénesis inducida por tres dipirido-imidazoles (de Mester y Vervaet, 1988).

En cuanto a la inhibición de la proliferación celular estudios *in vitro* muestran que los beta-carbolinos harmano y el norharmano reducen el crecimiento de líneas celulares de neuroblastoma humano (Uezono *et al.*, 2001). Mientras que el harmino inhibió significativamente el crecimiento celular *in vivo* de tumores de piel en ratones en los que se observó además un efecto apoptótico (Lamchouri *et al.*, 1999;)

Muchos agentes intercalantes son inhibidores de las topoisomerasas dando como resultado la formación de complejos entre la enzima y el DNA favoreciendo el rompimiento de la hebra de DNA (Chen y Liu 1994; Wang, 1996 y 1998; Hammonds *et al.*, 2000). Las DNA topoisomerasas son enzimas que catalizan la interconversión topológica de isómeros de DNA (Wang, 1996). Existen dos clases de topoisomerasas las del tipo I que actúan produciendo un corte transitorio en una de las hebras de DNA, haciendo rotar uno de los extremos alrededor de la hebra intacta y volviendo a unir los extremos antes separados (Lehninger, 1995), Entre otras funciones está la participación en la transcripción por RNA polimerasas I, II y III y también tiene actividad de quinasa (Guichard y Danks, 1999). Las topoisomerasas de tipo II cortan y empalman ambas cadenas de una doble hélice simultáneamente, formando intermediarios covalentes con los extremos 5'. A diferencia de las primeras, las topoisomerasas de tipo II son enzimas homodiméricas, es decir, se constituyen con dos mitades idénticas y requieren ATP para su funcionamiento. Ambas enzimas tienen importancia en la replicación, recombinación, transcripción, condensación cromosómica y en el mantenimiento de la estabilidad genómica (Liu, 1989). También son utilizadas como dianas para diversas drogas antitumorales. Funayama y colaboradores (1996) demostraron que el harmano y el harmalino inhiben la actividad de relajación de las topoisomerasas I y II.

## Bioensayos

Los bioensayos son herramientas desarrolladas por los investigadores para evaluar los efectos tóxicos, citotóxicos y genotóxicos de los diferentes compuestos químicos a los que el hombre está expuesto. Entre ellos el ensayo de micronúcleos es una de las metodologías más empleadas para evaluar la inducción de rompimientos y pérdida cromosómica. Los micronúcleos (MN) son corpúsculos intracitoplasmáticos de cromatina separados del núcleo principal que se forman durante la transición de metafase a anafase (Rigger, 1981). El primero en encontrar MN en eritrocitos fue el hematólogo Howell (1891), y después fueron descritos por Jolly, de aquí surge el nombre de cuerpos de Howell-Jolly. Evans y colaboradores (1959) realizaron el primer estudio en el que utilizaron a los MN para monitorear el daño citogenético inducido por rayos gamma en presencia y ausencia de oxígeno. Los micronúcleos se originan a partir de rompimientos de cromosomas (fragmentos cromosómicos acéntricos) que pueden ocurrir durante G1 ó G2, o bien por cromosomas que sufren rezago anafásico (daño del huso acromático) o inactivación del centrómero (que origina micronúcleos de mayor tamaño), lo cual se traduce en la aparición de un micronúcleo en el citoplasma de células nucleadas. El registro de micronúcleos puede realizarse fácilmente y en diferentes células como linfocitos, fibroblastos y células exfoliadas de epitelio bucal y de orina.

El empleo de citocalasina B, metabolito aislado del hongo *Helminthosporium dematoideum* que inhibe la polimerización de actina impidiendo la citocinesis, permite el análisis de células binucleadas que han sufrido una sola división (Fenech, 1993; 2000). La citocalasina B se utiliza con la finalidad de distinguir fácilmente entre células mononucleadas las cuales no se han dividido y las células binucleadas las cuales han completado una sola división celular (Fig. 4).



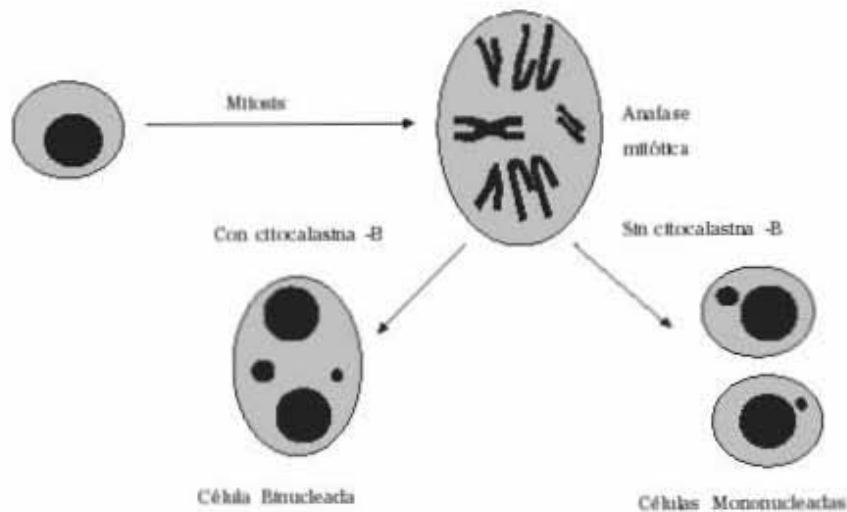


Figura 4. Obtención de células binúcleadas en presencia de citocalasina B y de mononucleadas en su ausencia.

Otro de los ensayos empleados recientemente para evaluar la capacidad citotóxica a través de la inhibición en la proliferación celular de diversos compuestos químicos que se sospecha podrían tener actividad antitumoral, es el de viabilidad y crecimiento de colonias en líneas celulares transformadas y normales. La mayoría de los cultivos celulares tanto vegetales como animales sobreviven, se multiplican e incluso expresan propiedades diferenciales en una placa de cultivo en condiciones adecuadas. Las células pueden visualizarse al microscopio o analizarse bioquímicamente, y se pueden estudiar los efectos de diferentes moléculas. La mayoría de las células de los vertebrados mueren tras un número finito de divisiones en cultivo. Sin embargo, ocasionalmente surgen algunas células que han sufrido algún cambio genético que las hace inmortales. Estas células proliferan indefinidamente y pueden propagarse como una línea celular (Alberts *et al.*, 2002). Las líneas celulares preparadas a partir de células cancerosas difieren de las preparadas a partir de células normales, en varios aspectos; por ejemplo a menudo las líneas de células cancerosas crecen sin fijarse a ninguna superficie y proliferan en una placa de cultivo hasta una densidad mayor. Sin embargo, es importante reconocer que las células de ambos tipos de líneas celulares casi siempre difieren de sus células progenitoras (Alberts *et al.*, 2002). De modo que los ensayos con líneas

celulares permiten evaluar la capacidad de diversos xenobióticos con capacidad antitumoral.

## **Justificación**

Los beta-carbolinos son alcaloides que se encuentran en diferentes plantas ampliamente distribuidas y en una gran variedad de productos alimenticios tales como el trigo, el arroz, el maíz, la cebada, la soya, el centeno, las uvas y diversas bebidas alcohólicas. Se conocen sus efectos alucinógenos ya que su mecanismo de acción es a través de la inhibición de la enzima monoaminooxidasa. Se sabe también que inhiben a las topoisomerasas I y II y que son capaces de intercalarse en el DNA. Sin embargo, no se tienen muchas evidencias sobre la comparación entre la estructura química y la actividad genotóxica en linfocitos humanos in vitro. Así mismo se desconoce su potencial citotóxico en líneas celulares normales y transformadas.

## **Objetivo General**

- Comparar actividad genotóxica y citotóxica inducida por dos alcaloides  $\beta$ -carbolinos: harmino y harmalino.

## **Objetivos particulares**

- Estimar genotoxicidad inducida mediante la frecuencia de micronúcleos en linfocitos humanos en cultivo de 72 hrs. expuestos a diferentes concentraciones de harmino y harmalino.
- Evaluar el daño citotóxico inducido mediante la cinética de proliferación celular.
- Con base en la respuesta comparar la relación entre la estructura química y la actividad genotóxica.

- Cuantificar la viabilidad y la proliferación de diversas líneas celulares (normales y cancerosas) expuestas a diferentes concentraciones de los beta-carbolinos.
- Evaluar el efecto citotóxico inducido mediante el empleo de cultivos celulares normal y transformado.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Compuestos químicos

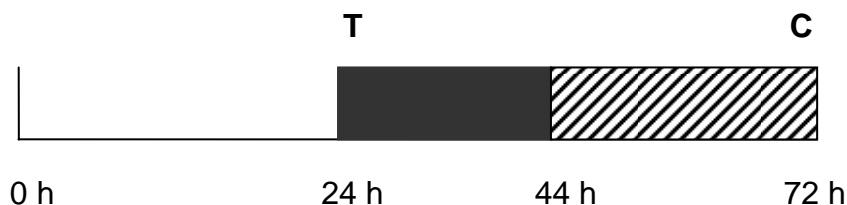
Hidrocloruro de Harmino:  $C_{13} H_{12} N_2 O \cdot HCl$  Peso molecular: 248.71 (CAS 343-27-1) Harmalino (Dihidro- $\beta$ -carbolino),  $C_{13} H_{14} N_2 O$  peso molecular: 214.26 (CAS 6027-98-1). Mitomicina C (MMC):  $C_{15} H_{18} N_4 O_5$ , peso molecular 334.33 (CAS 50-07-7). Todos se adquirieron en Sigma Co. (St. Louis, Mo.USA) ([www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)).

### Ensayo de micronúcleos

#### **Criterios de inclusión de los individuos**

Estudiantes de la Facultad de Ciencias de 25 a 35 años, con ayuno de al menos 8 horas, que no fumen ni tomen drogas y que en el momento de la toma de muestra no estén enfermos ni tomando medicamentos. Explicar a los donantes los objetivos del estudio con el propósito de obtener su consentimiento para emplear su muestra en los experimentos. Se aplicó un cuestionario con el objetivo de conocer su estado nutricional y sus hábitos (Anexo 1).

## Diseño experimental



El tiempo cero representa la siembra de los linfocitos en tubos cónicos de 15 ml con cuatro mililitros de medio McCoy y fitohemaglutinina que funciona como un mitógeno estimulando la salida de G<sub>0</sub> de los linfocitos y por tanto la mitosis. A las 24 horas se agregan las diferentes concentraciones de los beta carbolinos harmino y harmalino, en otro tubo la MMC (como control positivo), y otro tubo como control negativo (solución salina). A las 44 horas se adiciona la citocalasina B con el fin de inhibir la citocinesis; y a las 72 horas se realiza la cosecha y se procede al tratamiento de cada muestra para la realización de laminillas, tinción con Giemsa y su posterior análisis en microscopio óptico. Este procedimiento se realizó por duplicado para cada beta carbolino, además se llevaron a cabo dos repeticiones independientes.

### Obtención de la muestra

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron por venopunción durante las primeras horas del día; se utilizó como anticoagulante heparina (0.1ml). Las muestras fueron rotuladas y posteriormente procesadas. Cada muestra se trabajó por duplicado, se corrieron dos experimentos, lo que corresponde a un experimento y su repetición.

## Siembra

- 1) Centrifugar la muestra durante 30 minutos a 340g (1500 rpm) para separar los linfocitos.
- 2) Agregar 4 ml de medio McCoy y 0.25 ml de fitohemaglutinina [2.8%], en tubos cónicos de 15 ml.
- 3) Con una pipeta esterilizada colectar solo la capa blanca de la muestra centrifugada en la que se encuentran los linfocitos.
- 4) Incubar durante 24 hrs a 37°C.
- 5) Agregar MMC [3µg/ml] y las diferentes concentraciones, que se eligieron con base en la revisión bibliográfica realizada, de los alcaloides: (i) harmino [1, 10, 20 y 40 µM]; (ii) harmalino [0.858, 8.58, 17.167 y 34.33 µM]
- 6) A las 44 horas agregar 0.2 ml de Citocalasina B [3µg/ml] dejar incubar hasta las 72 horas.

## Cosecha

- 1) Sacar las muestras de la incubadora y centrifugar a 340g (1500 rpm lo que corresponde a 340g) durante 10 minutos.
- 2) Quitar sobrenadante agitar perfectamente, agregar 4ml de solución hipotónica [KCl al 0.075 M] fría, y dejar reposar 5 minutos volver a centrifugar a 340g durante 10 minutos.
- 3) Quitar sobrenadante agitar perfectamente el botón y agregar 1 ml de fijador (3 metanol :1 ácido acético). Mezclar muy bien centrifugar a (1500 rpm) durante 10 minutos.
- 4) Quitar el sobrenadante agregar 4ml de fijador y centrifugar a (1500 rpm) durante 10 minutos.
- 5) Repetir el paso anterior pero ahora centrifugar a 500 rpm (113.3g) quitar el sobrenadante hasta dejar aproximadamente 0.5 ml. Resuspender bien el botón y tomar con la pipeta unas gotas, dejarlas caer sobre el cubreobjetos lo más cerca posible del mismo, secar al aire libre.

- 6) Teñir las preparaciones con Giemsa por 4 minutos dejar secar y observar al microscopio a 40X.
- 7) Analizar y cuantificar 2000 células binucleadas por concentración y experimento.

Se han establecido a nivel internacional los criterios de inclusión para cuantificar células binucleadas (Fenech *et al.*, 2003) éstos son:

- ❖ Los dos núcleos en una célula binucleada tienen que mostrar las membranas nucleares intactas y deben situarse dentro del mismo límite citoplasmático.
- ❖ Los núcleos deben tener aproximadamente el mismo tamaño, patrón e intensidad de tinción.
- ❖ Éstos pueden estar ligados por un fino puente nucleoplasmático.
- ❖ Los núcleos principales se pueden tocar pero no sobrelapar uno sobre otro.
- ❖ El límite citoplasmático o membrana de la célula binucleada debe estar intacto y claramente distinguible del límite citoplásmico de células adyacentes.

Asimismo los criterios de inclusión para MN son los siguientes:

- ❖ El diámetro del MN debe ser mucho más pequeño que el núcleo principal puede variar entre una dieciseisava parte a una tercera parte del diámetro del núcleo principal.
- ❖ Los MN pueden ser redondos u ovalados.
- ❖ No deberán estar ligados o conectados al núcleo principal.
- ❖ Puede tocar pero no sobrepasar el núcleo principal de modo que el límite micronuclear sea distinguible.
- ❖ Debe tener la misma intensidad de tinción que el núcleo principal aunque podría estar teñido más intensamente.

Los cambios morfológicos que caracterizan a las células en apoptosis se pueden ver claramente en microscopía de luz (Willie, 1980). Los criterios para



determinar células apoptóticas y necróticas se han establecido a nivel internacional por Fenech y colaboradores (2002) en células apoptóticas se pueden diferenciar dos estadios que se pueden identificar: a) células apoptóticas tempranas presentan cromatina condensada en el núcleo y los límites citoplásmicos o nucleares permanecen intactos; b) las células apoptóticas tardías exhiben fragmentación nuclear o bien pequeños cuerpos nucleares con citoplasma intacto o membrana citoplásmica intacta; presentan una gran intensidad en la tinción del núcleo, los fragmentos nucleares y del citoplasma en comparación con las células normales. En las células necróticas también hay dos estadios las células necróticas tempranas presentan un citoplasma descolorido con numerosas vacuolas; un discreto pero intacto núcleo y una membrana citoplasmática dañada en cambio las células necróticas tardías han perdido el citoplasma, contienen una estructura nuclear parcialmente intacta, la membrana nuclear es irregular y a menudo el material nuclear esta fuera de los cuerpos nucleares; la tinción que se observa en el núcleo y el citoplasma es menos intensa con respecto a las células normales. Con base en estos criterios se identificaron las células apoptóticas y necróticas que se observaron en esta investigación.

### **Tratamiento estadístico**

La prueba de  $\chi^2$  se empleó para determinar si las réplicas y las repeticiones de los experimentos podían sumarse, a una  $P < 0.05$ . El índice de proliferación celular [CBPI por sus siglas en inglés (Cytochalasin Blocking Proliferation Index)] se obtuvo a partir de la fórmula matemática sugerida por Eastmond y Tucker (1989):

$$CPBI = \frac{MN + 2(BN) + 3(TRI) + 4(TETRA) \dots}{N}$$

En el numerador se suman el número de células que contienen uno (MN), 2(BN), 3(TRI), 4(TETRA).... Micronúcleos, y en el denominador se anotan el total de células cuantificadas. Las diferencias interindividuales e intraindividuales de los donadores que participaron en la investigación se midieron a través de una ANOVA. Para el cálculo de todas las pruebas estadísticas se empleó el programa de cómputo Statistica (versión 6.0).

## **Ensayo de viabilidad**

Las líneas que se utilizaron para realizar el ensayo de viabilidad y el de crecimiento de colonias fueron las siguientes: Fibroblastos (control), HeLa (adenocarcinoma cervical humano), SW480 (carcinoma de colon) y C33 (carcinoma cervical humano) (Hay *et al.*, 1994). Las características de las líneas celulares se describen en el anexo 3.

## **Método**

- 1) Limpiar el área de trabajo de la campana de flujo laminar, lavar las manos con alcohol y colocar los guantes.
- 2) Crecer las células en una caja de 75 cm<sup>2</sup> con 15 ml de medio DMEM a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en incubadora por lo menos de 3-5 días. Revisar al microscopio a 10X si hay adherencia de las células entre un 60 y un 80%. Si ya se tiene la confluencia deseada quitar el medio de la caja con ayuda de una pipeta Pasteur y lavar dos veces con 10 ml de PBS a pH de 7. Retirar éste con una pipeta Pasteur. A continuación agregar 1ml de tripsina [0.05%] disuelta en un bufer de fosfatos a pH 6, meter la caja en la incubadora y esperar de 3-5 minutos, una vez despegadas las células agregar a la caja 9 ml de medio DMEM resuspender y cuantificar en una cámara de Neubauer.
- 3) Obtener la relación que hay por mililitro y la relación para obtener 20.000 células en 100 µl.
- 4) En cajas de 96 pozos poner 100µl por pozo, las muestras se ponen por cuadruplicado. Dejar que se adhieran por 24 horas y al día siguiente agregar las concentraciones de alcaloides beta carbolinos harmino y harmalino correspondientes a 20 y 40µM correr el control concurrente (solución salina). Incubar por 4 horas, eliminar el medio y lavar dos veces con PBS. Agregar 50µl de la sal de tetrazolio (XTT) y el acoplador y 50µl de medio a cada pozo, dejar incubar a 37° C por 24 horas.
- 5) Sacar de la incubadora y leer en un espectrofotómetro a 480 nm. Las células viables muestran un color naranja.

## **Ensayo de crecimiento de colonias**

### **Método**

- 1) Crecer las células en una caja de 75 cm<sup>2</sup> con 15 ml de medio DMEM suplementado con suero fetal al 10% incubar a 37°C y 5% de CO<sup>2</sup> mover en círculos y en forma de cruz. Incubar de 3-5 días revisar periódicamente al microscopio a 10X y verificar que haya el 100% de confluencia.
- 2) Retirar el medio y lavar dos veces con PBS a pH de 7. Agregar 1ml de tripsina [0.05%] meter a incubadora por 2 ó 3 minutos, sacar la caja, agregar 9 ml de medio, resuspender y vaciar en un tubo cónico de 13ml, resuspender perfectamente bien en vortex, cuando desaparezcan los grumos dentro del tubo cuantificar en cámara de Nuebauer.
- 3) Obtener la relación de células por ml y determinar cuantos µl deben llevar 100,000 células de tal forma que a la hora de sembrar quede una relación de 100,000 células en 3 mililitros.
- 4) En cajas de 35 mm sembrar 3ml, agitar en forma circular y de cruz antes de meter a la incubadora.
- 5) Dejar incubar para que se adhieran y formen el 100% de confluencia revisar a las 72 h. para verificar la confluencia.
- 6) Obtenida la confluencia agregar las diferentes concentraciones a probar del hidrocloreuro de harmino (control 10, 20 y 40µM).
- 7) Dejar incubar por 3 horas, una vez pasado el tiempo sacar de la incubadora quitar el medio, lavar con PBS dos o tres veces agregar 0.5ml de tripsina meter a la incubadora y esperar de 2-3 minutos. Una vez despegadas aspirar los tres mililitros, depositar en tubos cónicos de 13 ml y aforar a 10 ml con DMEM sin suero fetal.
- 8) Mezclar perfectamente bien y cuantificar el número de células por mililitro, calcular la relación para obtener una tercera dilución en la cual se utilizará DMEM suplementado con suero fetal al 10%. La concentración final de células deberá ser de 700-710 células en 10 ml y a su vez se tendrá una relación final de 200-213 células en 3 ml. De

cada tubo se obtendrán dos cajas de 35 mm esto se realizó para cada una de las concentraciones empleadas.

- 9) Una vez sembradas en cajas de 35mm marcadas con fecha, alcaloide y concentración y perfectamente mezcladas meter a incubar por 10 días.
- 10) Revisar periódicamente para seguir el crecimiento de las colonias y una vez que se obtenga un diámetro no mayor a 0.5 mm están listas para retirar de la incubadora.
- 11) Retirar el medio, lavar con PBS y agregar 3 ml de metanol para fijar las células dejar secar al aire; una vez secas agregar 3 ml de Giemsa que se encuentra en una relación de 1 de agua destilada: 6 de Giemsa dejar 30 minutos eliminar el colorante y lavar con agua de la llave.
- 12) Dejar secar al aire y cuantificar el número de colonias por caja y por concentración obtener un promedio de las mismas.

Los resultados obtenidos se expresaron mediante la media  $\pm$  la desviación estándar, parámetros que resultaron al promediar tres placas por cada experimento. Cada experimento se repitió al menos tres veces. Los datos se analizaron mediante el programa Statistica versión 6.0 a un nivel de significancia de  $P < 0.05$

### 3. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el ensayo de micronúcleos se muestran en la tabla 1. Se analizaron en cada individuo un total de al menos 4,000 células binucleadas por concentración, las que resultaron de la suma de un experimento y su repetición. Se contaron también el número de células mono, tri, tetra y pentanucleadas. De modo que el total de células analizadas por concentración fue mayor a 5,500 en la concentración más baja y en los testigos concurrentes negativo y positivo. En las concentraciones intermedias así como en la más alta de los dos beta carbolinos estudiados la sobrevivencia celular se redujo considerablemente.

El hidrocloreuro de harmino mostró inducir tanto células apoptóticas como necróticas (Fig. 7) en los dos géneros y en las concentraciones de 20 y 40  $\mu\text{M}$  por lo que este compuesto mostró ser altamente citotóxico (Tabla 2).

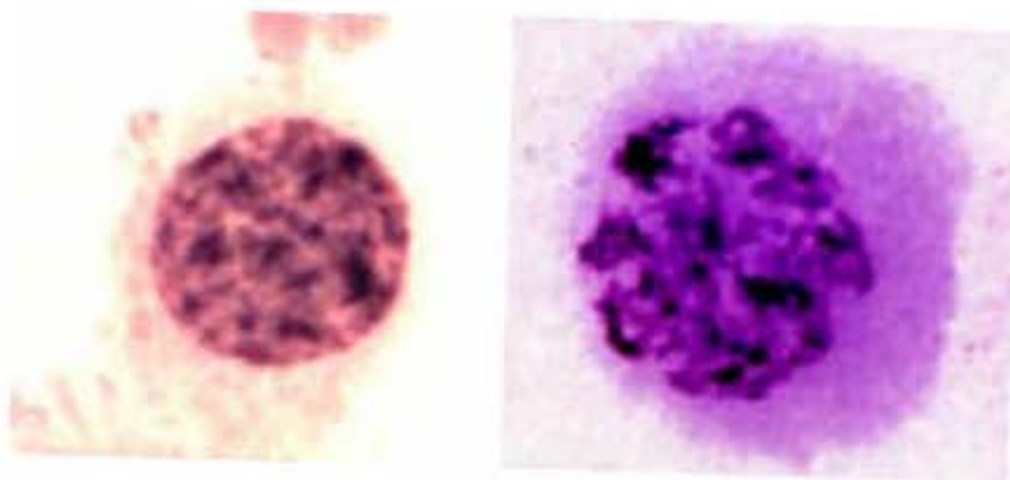


Figura 7. Se muestran células mononucleadas con severo daño en la estructura nuclear.

No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la respuesta obtenida por género con ambos compuestos (Gráficas 1 y 2). Sin embargo, el hidrocloreuro de harmino en las concentraciones de 1 y 20  $\mu\text{M}$  en la donadora femenina y en 10 para el donador masculino así como el harmalino en la donadora femenina y en la concentración de 8.58  $\mu\text{M}$  mostraron inducir una respuesta positiva al comparar estas frecuencias con las obtenidas por el control negativo. Estas diferencias podrían deberse a factores tales como el

estilo de vida, a la variabilidad inherente de los individuos o bien a diferencias en la susceptibilidad individual. El índice de proliferación celular varió entre 1.75 y 1.97 para el harmalino y entre 1 y 2 para el hidrocloruro de harmino. Parámetro que corrobora la citotoxicidad inducida por el beta carbolino aromático.

El ensayo colorimétrico XTT permite descartar a las células vivas de las muertas, mediante el cambio de coloración que se detecta a 480nm ver figura 8. Los resultados del ensayo de viabilidad se muestran en la tabla 3 en la que puede notarse los datos obtenidos en cada uno de los cuatro experimentos realizados, así como, la media y la desviación estándar calculadas. El harmino redujo la viabilidad de los fibroblastos (línea celular control) y de la línea C33 (carcinoma cervical humano) mientras que el harmalino redujo la viabilidad de todas las líneas celulares estudiadas, por lo cual este beta carbolino resultó ser inespecífico (Gráfica 4). Debido a ello solamente se empleó el harmino en los experimentos para evaluar su efecto en el ensayo de crecimiento de colonias. En la tabla 4 se encuentran los resultados obtenidos en esta serie de tres experimentos. Puede notarse que el porcentaje de inhibición fue directamente proporcional a la dosis y que el mayor efecto inhibitorio se obtuvo en las líneas transformadas SW480 y C33 (Gráfica 5). Estos resultados correlacionan con el marcado efecto citotóxico obtenido por el harmino en el ensayo de micronúcleos.



Figura 8. Placa de 96 pozos con dos líneas celulares transformadas HeLa y SW480 evaluando de forma simultánea los dos beta carbolinos harmino y harmalino respectivamente.

#### 4. DISCUSIÓN

El ensayo de micronúcleos se ha utilizado para evaluar el efecto genotóxico, tanto *in vivo* como *in vitro*, de diversos compuestos químicos y ha mostrado ser un buen indicador de aquellos que son capaces de romper cromosomas. El uso de citocalasina B permite tener la certeza de que las células han completado una división celular y que los productos permanecen en un mismo citoplasma (Fenech, 1993). El daño al DNA también puede evaluarse cuantificando el número de células apoptóticas y necróticas, para lo cual puede emplearse una metodología en la que se prescinde del uso de la solución hipotónica (Fenech *et al.*, 1999). En este estudio, a pesar de no haber utilizado la metodología propuesta por estos autores para cuantificar células apoptóticas y necróticas ya que no se contemplaban estos parámetros entre los objetivos específicos, se encontró que el harmino redujo considerablemente la proliferación celular e indujo cambios morfológicos asociados con los que se observan en células apoptóticas y necróticas. Por lo que el daño al DNA inducido por este alcaloide fue objetivamente muy evidente y dio pie para estudiar sus efectos sobre la inhibición del crecimiento en líneas celulares normales y transformadas.

La necrosis y la apoptosis ocasionada por el harmino podrían estar relacionadas con múltiples señales en organelos clave tales como las mitocondrias, los lisosomas y el retículo endoplásmico. Su efecto apoptótico está asociado con la modulación de Bcl-2 y Fas, pero no con Bax y p53 (Qi *et al.*, 2004). Esta capacidad para inducir apoptosis es uno de los mecanismos que presenta para matar a las células cancerígenas. Esto podría explicar la inducción de apoptosis en los linfocitos. Sin embargo, el efecto necrótico podría deberse a la falta de señales que establecen el mecanismo que las células deben seguir y por lo tanto que les permitan seleccionar el proceso a ejecutar.

Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran que en linfocitos humanos *in vitro* los beta carbolinos estudiados no aumentaron de forma consistente y significativa la frecuencia de MN por lo que se concluye que no son clastogénicos.



En cuanto a la relación estructura química – actividad genotóxica, se sabe que la diferencia principal de los beta carbolinos estudiados radica en que el harmino es un beta carbolino aromático, mientras que el harmalino es un dihidro-beta-carbolino aromático. Los beta carbolinos aromáticos tienen la facilidad de intercalarse en el DNA mientras que los dihidro-beta carbolinos no, esto provoca que el harmino sea potencialmente genotóxico mientras que el harmalino no posea esta capacidad (Duportail y Lami 1975; Duportail, 1981; Hardiman *et al.*, 1987). Los datos obtenidos en el presente trabajo no mostraron la capacidad de intercalación del compuesto aromático fundamentalmente porque el ensayo de genotoxicidad empleado (MN) no es capaz de evaluar a los agentes intercalantes. Sin embargo, si se encontraron efectos citotóxicos y de inhibición de la proliferación celular significativos tanto en el ensayo de micronúcleos como en el de inhibición de colonias.

Debido a que los datos obtenidos en el ensayo de MN mostraron que los beta carbolinos estudiados y en particular el harmino indujo los fenómenos de apoptosis y de necrosis se decidió probar a ambos alcaloides beta carbolinos en otros bioensayos para corroborar su efecto citotóxico sobre la proliferación celular para lo cual se realizaron pruebas de viabilidad y ensayo de crecimiento de colonias en líneas celulares transformadas y en una línea celular normal.

Para los ensayos de viabilidad y crecimiento de colonias, se emplearon dos líneas celulares transformadas de cáncer cervico-uterino (HeLa y C33) ya que este tipo de tumor maligno se presenta con una frecuencia muy alta (21%) en las mujeres mexicanas, mientras que el cáncer de colon ocupa el décimo lugar en la incidencia de tumores malignos en la población mexicana ([www.inegi.gob.mx/2006](http://www.inegi.gob.mx/2006)). Esta línea transformada (SW480) así como la línea celular normal (fibroblastos) empleada como testigo eran las únicas disponibles en nuestro grupo de trabajo.

El ensayo de crecimiento de colonias permite evaluar el potencial citotóxico mediante la inhibición de la proliferación celular de los compuestos químicos que se sospecha son anticancerígenos (Abdullaev *et al.*, 2003). El

parámetro más importante de este ensayo es el relativo al porcentaje de inhibición del crecimiento en las células transformadas estudiadas. Un primer acercamiento al potencial inhibitorio inducido se establece mediante el ensayo de viabilidad, que permite cuantificar la cantidad de células vivas sometidas al tratamiento con el compuesto químico sujeto a prueba. Con base en los resultados obtenidos en este ensayo se puede establecer la pertinencia del empleo del ensayo más específico de crecimiento de colonias a partir de líneas celulares transformadas. En este trabajo se encontró que el harmalino tuvo una respuesta inespecífica en el ensayo de viabilidad, ya que, todas las líneas celulares malignas e incluso la de fibroblastos respondieron de forma parecida, en mayor o menor medida. Por esta razón en el ensayo de crecimiento de colonias solamente se analizó el efecto inducido por el harmino. Este beta-carbolino redujo la proliferación celular de todas las líneas celulares malignas, pero no del control, y mostró ser un poco más efectivo en la inhibición del crecimiento de la línea de carcinoma de colon (SW480).

El efecto de inhibición de la proliferación celular inducido por ambos alcaloides puede explicarse con base en diferentes mecanismos mediante los cuales podría producirse este fenómeno. El más importante es el relacionado con su propiedad de intercalación en el DNA. Un compuesto intercalante es aquel que gracias a su estructura aromática policíclica es capaz de introducirse entre las bases nitrogenadas del DNA provocando cambios en la configuración de esta molécula, los cuales en última instancia provocan alteraciones en diversos mecanismos en los cuales está involucrado el DNA, tales como, la replicación, la reparación y la transcripción. Los beta carbolinos estudiados son compuestos químicos aromáticos tricíclicos, estructura que les facilita la propiedad de intercalación, ambos compuestos comparten la presencia de los mismos grupos reactivos (metoxilo y metilo) en las mismas posiciones, algunos autores han atribuido la capacidad de intercalación al grupo metoxilo que se encuentra en el C7 de ambos alcaloides (Taira *et al.*, 1997). Mientras que otros autores demuestran que la intercalación se debe a la presencia del grupo alkilo (metilo) en la posición 1 de ambos alcaloides (Cao *et al.*, 2005). La única diferencia estructural entre los beta carbolinos estudiados se refiere a que el harmino es un compuesto aromático completo mientras que el harmalino es un

dihidro aromático. Esta pequeña diferencia estructural provoca una reactividad mayor del harmino en comparación con el harmalino y podría explicar, al menos en parte, la citotoxicidad inducida por este beta-carbolino. Este fenómeno podría influir también en la actividad enzimática y en los procesos de reparación del DNA (Funayama *et al.*, 1996; Remsen y Cerutti, 1979).

Otro de los mecanismos a los cuales puede atribuirse la respuesta encontrada es la capacidad del harmino de reducir y/o inhibir la proliferación celular. Se ha reportado que este beta carbolino inhibe a las ciclinas dependientes de quinasas (Cdk1 y Cdk2) de una manera competitiva con el ATP-Mg<sup>2+</sup> efecto que impide que continúe el ciclo celular, de modo que el harmino es un inhibidor específico de la proliferación celular (Song *et al.*, 2004). La importancia de los complejos Cdk1-ciclina A y Cdk1-ciclina B es que inducen los acontecimientos de la mitosis hasta la metafase. Las ciclinas A y B son poliubiquitinizadas por el complejo promotor de la anafase (APC), al final de ésta y luego son degradadas en los proteosomas (Lodish *et al.*, 2002). Durante el ciclo celular Cdk2 es un regulador maestro que permite la replicación del DNA y la progresión a la fase S del ciclo celular (Song *et al.*, 2004). Esta información respalda los resultados obtenidos en el ensayo de crecimiento de colonias en donde se demostró que hay especificidad sobre la inhibición del crecimiento celular en las líneas celulares transformadas (SW480).

Por último las topoisomerasas son las enzimas involucradas en los cambios topológicos del DNA (espiralización y desespiralización), por lo tanto juegan un papel esencial en las funciones que esta molécula realiza y representan el blanco molecular de muchos compuestos anticancerígenos (Sobhani *et al.*, 2002). La DNA topoisomerasa I (Topo I) cataliza los rompimientos de hebra sencilla, mientras que la Topo II cataliza los rompimientos de doble hebra (Wang, 1996; 1998). Los mecanismos de acción de las DNA topoisomerasas han sido ampliamente estudiados así como los compuestos químicos que son capaces de inhibirlas. En particular el harmino y sus derivados ha mostrado ser capaces de inhibir a las topoisomerasas I, efecto que se debe al grupo alkilo que se encuentra en la posición 9 del núcleo

de los beta carbolinos (Cao *et al.*, 2005). Este efecto podría estar relacionado con la respuesta citotóxica y citostática encontrada en el presente trabajo en los ensayos de genotoxicidad y de inhibición del crecimiento de células transformadas.

En conclusión los beta carbolinos estudiados no mostraron ser capaces de romper a los cromosomas pero si se encontró que son citotóxicos ya que inhiben la proliferación celular en líneas celulares transformadas, efectos que están relacionados con su estructura química, su capacidad de intercalación y de inhibición de las DNA topoisomerasas. La búsqueda de compuestos antitumorales, naturales o sintéticos, específicos debe estar acompañada de bioensayos que permitan demostrar inequívocamente estos efectos, por lo que para comprobar los resultados obtenidos en este trabajo será necesario ampliar los estudios a otros bioensayos in vivo, en particular, en mamíferos.

## 5. CONCLUSIONES

- Se comparó la relación entre la estructura química y la actividad genotóxica: la aromaticidad completa del harmino aparentemente es suficiente para explicar, al menos en parte, las diferencias encontradas.
- Ninguno de los dos beta carbolinos evaluados fue clastogénico.
- El harmino resultó ser citotóxico en el ensayo de micronúcleos y más específico y eficiente en la inhibición de las líneas celulares transformadas.
- Se demostró que el harmino presenta un claro efecto citotóxico en los bioensayos de MN y de crecimiento de colonias.
- Al presentar un marcado efecto citotóxico el harmino podría ser un buen candidato para ser utilizado en la terapia del cáncer de colón en un futuro, por lo que se recomienda realizar otros ensayos, en particular in vivo, que permitan corroborar este efecto.

## REFERENCIAS

Abdullaev, F.I., Riverón-Negrete, L., Caballero-Ortega, H., Hernández, J.M., Pérez-López, I., Pereda-Miranda, R. Espinosa-Aguirre, J.J. 2003. Use of *in vitro* assays to assess the potencial antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L). *Toxicol. In Vitro* 17: 731-736.

Adachi, J., Mizoi, Y., Naito, T., Yamamoto, K., Fujiwara, S., Ninomiya, I. 1991. Determination of  $\beta$ -carbolines in foodstuffs by high performance liquid chromatography and high performance liquid chromatograph-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 538: 331-339.

Airaksinen M.M., Kari I. 1981. Beta-carbolines, psychoactive compounds in the mammalian body Part II: Effects. *Med. Biol.* 59: 190-211.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. 2002. *Biología Molecular de la Célula*. Omega. Barcelona. pp. 167-168.

Aqeel A., Khursheed A.K., Sabiha S., Bina S.S., Sabira B., Shaheen F. Salimuzzaman S. 1992. Study of the *in vitro* antimicrobial activity of harmine, harmaline and their derivates. *J. Ethnophar.* 35: 289-294.

Balón M., Muñoz M.A., Carmona C., Guardado P., Galán M.. 1999. A fluorescence study of the molecular interactions of harmane with the nucleobases, their nucleosides and mononucleotides. *Biophys. Chem.* 80: 41-52.

Barbaccia M.L., Melloni P., Pozzi O., Costa E. 1986. [3H]imipramine displacement and 5HT uptake inhibition by tryptoline derivatives: in rat brain 5-methoxytryptoline is not the autacoid for [3H]imipramine recognition sites. *Eur. J. Pharmacol.* 123: 45-52.

Boeira J. M., da Silva J., Erdtmann B., Henriques J. A. 2001. Genotoxic effects of the alkaloids harman and harmine assessed by comet assay and chromosome aberration test in mammalian cells *in vitro*. *Pharmacol. Toxicol.* 89: 287-94.

Boeira J.M., Viana A.F., Picada J.N., Henriques J.A. 2002. Genotoxic and recombinogenic activities of the two beta-carline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 500: 39-48.

Bonassi S., Fenech M., Lando C., Lin Y.P., Ceppi M., Chang W.P. 2001. HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ. Mol. Mutagen.* 37: 31-45.

Bruneton J., 1992. Drogas con alcaloides derivados del triptofano, en: Elementos de Fotoquímica y de Farmacognosia, Zaragoza, Acribia, pp. 466-470.

Bukvic N., Gentile M., Susca F., Fanelli M., Serio G., Buonadonna L. 2001. Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenarians. *Mutat. Res.* 498: 159-167.

Burkard W. P., Bonetti E. P., Haefely W. 1985. The benzodiazepine antagonist Ro 15-1788 reverses the effect of methyl-beta-carboline-3-carboxylate but not of harmaline on cerebellar cGMP and motor performance in mice. *Eur. J. Pharmac.* 109: 241-247.

Burrow E.G., Tyrl J.R. 2001. Toxic Plants of North America. Iowa . Tate/Press. U.S.A., pp. 1194-1204.

Callaway J.C., Raymon L.P., Hearn W.L., Mckenna D.J., Grob C.S., Brito G.S., Mash D.C. 1996. Quantitation of N-N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. *J. Anal. Toxicol.* 20: 492-497.

Cao R., Wenlie P., Hongsheng C., Yan M., Xiaodong L., Xuerui H., Huaji G., Anlong X. 2005. DNA binding properties of 9-substituted harmine derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338: 1557-1563.

Chen A.Y. y Liu L.F. 1994. DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34: 191-218.

Codding P.W. 1983. Structure-activity studies of  $\beta$ -carboline 1. Molecular structure and conformation of cis-3-carboxylic acid 1,2,3,4-tetrahydroharmine dehydrate. *Can. J. Chem.* 61: 529-532.

de Meester C. Ch. Vervaet 1988. Relationships between chemical structure and mutagenic activity of  $\beta$ -carboline compounds. Proceedings XVIIIth Annual Meeting EEMS. Varna, 3-8/10:130.

de Meester C. 1995. Genotoxic potential of beta-carbolines: a review. *Mutat. Res.* 339: 139-153.

Di Giorgio C., Delmas F., Ollivier E., Elias R., Balansard G., Timon-David P. 2004. In vitro activity of the  $\beta$ -carboline alkaloids harmine, harmaline and harmaline toward parasites of the species *Leishmania infatum*. *Exp. Parasitol.* 106: 67-74.

Du W., Harvey J.A. 1997. Harmaline-induced tremor and impairment of learning are both blocked by dizolpizine in the rabbit. *Brain Res.* 745: 183-188.



Duan J.N., Zhou R.H, Zhao S.X. 1998. Studies on the chemical constituents of *peganum multisectum* maxim I. The alkaloids from seeds and antitumor activity. *J. China Pharm. Univ.* 29: 21-23.

Duportail G. 1981. Linear and circular dichroism of harmine and harmaline interacting with DNA. *Int. J. Biol. Macromol.* 3: 188-193.

Duportail G., Lami H. 1975. Studies of the interaction of the fluorophores harmine and harmaline with calf thymus DNA. *Biochim. Biophys. Acta* 402: 20-30.

Evans H.J., Neary G.J., Tonkinson S.M. 1959. The effect of oxygen on the induction by gamma radiation of mitotic delay in root tips of *Vicia faba*. *Exp Cell Res.* 17: 144-59.

Fenech M., Chang W.P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S., Zeiger E. 2003. HUman Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 534: 65-75.

Fenech M., Crott J.W. 2002. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat. Res.* 504: 131-136.

Fenech M., Holland N., Chang W.P., Zeiger E., Bonassi S. 1999. The HUman MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.* 428: 271-283.

Fenech M. 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.* 285: 35-44.

Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455: 81-95.

Fernández de Arriba., J.M. Lizcano., M.D., Balsa M., Unzeta M. 1994. Inhibition of monoamine oxidase from bovine retina by  $\beta$ -Carbolines. *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 809-813.

Fuller R.W., Wong C.J., Hemrick-Luecke S.K. 1986. MD. 240928 and harmaline: opposite selectivity in antagonism of the inactivation of types A and B monoamine oxidase by pargyline in mice. *Life Sci.* 38: 409-412.

Funayama Y., Nishio K., Wakabayashi K., Nagao M., Simio K., Ohira T., Hasegawa S., Saijo N. 1996. Effects of  $\beta$ - and  $\gamma$ -carboline derivatives on DNA topoisomerase activities. *Mutat. Res.* 349: 183-191.

Guichard, S.M., Danks M,K. 1999. Topoisomerase enzymes as drug targets. *Curr. Op. Oncol.* 11: 482-489.

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

Hardiman J., Carrel H.L., Zacharias D.E., Glusker J.P. 1987. The structure of harman, a comutagen. *Bioorganic Chem.* 15: 213-223.

Hashimoto Y., Kawanishi K., Moriyasu M. 1988. Forensic chemistry of alkaloids. En: *The Alkaloids*, Vol. 32, Academic Press, San Diego, pp. 40-45.

Hay R. et al. 1994. ATCC Cell Lines and Hybridomas. American Type Culture Collection, pp. 640.

Hazen M. J., Gutierrez-González M.G. 1988. UV-mediated toxic bioactivity of harmine in the meristematic cells of *Allium cepa*. *Mutagenesis* 3: 333-337.

Headley P. M., Lodge D., Duggan A. W. 1976. Drug-induced rhythmical activity in the inferior olivary complex of the rat. *Brain Res.* 101: 461-478.

Hudson A. L., Price R., Tyacke R.J., Lales M.D., Parker C.A., Nutt D.J. 1999. Harmane, norharmane and tetrahydro  $\beta$ -carboline have high affinity for rat imidazole binding sites, *Br. J. Pharmacol.* 126: 2

Ishida J., H. K, Wang, K. F. Bastow, C-Q. Hu, K. H. Lee. 1999. Antitumor agents: Cytotoxicity of harmine and related  $\beta$ -carboline analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9: 3319-3324.

Johnson F.B. 1982. Chemical interactions with herpes simplex type 2 virus: enhancement of transformation by norharman. *Carcinogenesis* 3: 457-459.

Kamel S., Ibrahim L., Afifi A., Hamza S. 1970. Major alkaloidal constituents of the Egyptian plant. *Peganum harmala*. *UARJ, Vet. Sci.* 71-86.

Kim H., Sablin S.O., Ramsay R.R. 1997. Inhibition of monoamine oxidase A by  $\beta$ -carboline derivatives, *Arch. Biochem. Biophys.* 337:137-142.

Knowles W.D., Phillips M.I. 1980. Neurophysiological and behavioral maturation of cerebellar function studied with tremorogenic drugs. *Neuropharmacology* 19: 745-756.

Kumar S., Limpman R., Tomasz M. 1992. Recognition of specific DNA sequences by mitomycin C for alkylation. *Biochemistry* 31: 1399-1407.

Lamarre Y., Mercier L. A. 1971. Neurophysiological studies of harmaline-induced tremor in the cat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 49: 1049-1058.

Lamchouri F., Settaf A., Cherrah Y., Zemzami M., Lyoussi B., Zaid A., Atif N., Hassar M. 1999. Antitumor principles from *Peganum harmala* seeds. *Therapie* 54: 753-758.

Landi S., Iazzolino E., Barale R. 2000. Are baseline frequencies of SCEs, CAs, and MN in human lymphocytes related to hematological values? *Mutat. Res.* 469: 159-166.

Lee B.M., Lee S.K., Kim H.S. 1998. Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, beta-carotene and red ginseng). *Cancer Lett.* 132: 219-227.

Lee T.K, Allison R.R., O'Brien K.F., Khazanie P.G., Johnke R.M., Brown R. 2004. Ginseng reduces the micronuclei yield in lymphocytes after irradiation. *Mutat. Res.* 557: 75-84.

Lehninger, A.L., Nelson, D., Cox, M. 2004. Principles of Biochemistry. W.H.Freeman

Lewis A. R. 1998. Lewis' Dictionary of toxicology. Lewis Publishers. U.S.A. pp.1127.

Liu L. F. 1989. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 351-375.

Llinás R., Volkind R.A. 1973. The olivo-cerebellar system: functional properties as revealed by harmaline-induced tremor. *Exp. Brain Res.* 18: 69-87.

Llinás R.R. 1991. The noncontinuous nature of movement execution. En: *Motor Control: Concepts and Issues*. Humphrey DR, Freud H-J eds, Wiley, Chichester, UK, pp. 223-242.

Lodish H., Berk A., Zipursky L.S., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. 2002. *Biología Celular y Molecular*. Panamericana. España. P 526.

Mavournin K.H., Blakey D.H, Cimino M.C., Salomone M.F., Heddle J.A. 1990. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene Tox Program. *Mutat. Res.* 239: 29-80.

McGeer P.L., Eccles J.C., McGeer E.G.1978. *Molecular neurobiology of the mammalian brain*. Plenum Press, New York, pp. 295-320.

Migliore L, Guidotti P, Favre C, Nardi M, Sessa MR, Brunori E. 1991. Micronuclei in lymphocytes of young patients under antileukemic therapy. *Mutat. Res.* 263: 243-248.

Muñoz M.A., Guardado P., Galán M., Carmona C., Balón M. 2000. A esprestoscopic study of the molecular interactions of harmane with pyrimidine and other diazines. *Biophys Chem.* 83: 101-109.

O'Hearn E., Molliver M.E. 1993. Degeneration of Purkinje cells in parasagittal zones of the cerebellar vermis after treatment with ibogain or harmaline. *Neuroscience* 55: 303-310.

Ochiai M., Wakabayashi K., Sugimura T., Nagao M. 1986. Mutagenicities of indole and 30 derivatives after nitrite treatment. *Mutat. Res.* 95: 159-170.

Oda Y., Nakamura S., Oki I. 1988. Harman and norharman induce SOS responses and frameshift mutations in bacteria. *Mutat. Res.* 208: 39-44.

Palom Y., Suresh Kumar G., Tang L.Q., Paz M.M., Musser S.M., Rockwell S., Tomasz M. 2002. Relative toxicities of DNA cross-links and monoadducts: new insights from studies of decarbamoyl mitomycin C and mitomycin C. *Chem. Res. Toxicol.* 15: 1398-1406.

Pan Q. C., Yang X.P, Li C. J. 1997. Studies on the pharmacological action of the total alkaloid of *Peganum harmala*. *Acad. J. Sums.* 18: 165-167.

Picada J.N., da Silva K.V., Erdtmann B., Henriques A.T., Henriques J.A. 1997. Genotoxic effects of structurally related  $\beta$ -carboline alkaloids. *Mutat. Res.* 379: 135-49.

Poindexter, E. H., Carpenter, R. D. 1962. The isolation of harmaline and norharman from tobacco and cigarette smoke. *Phytochemistry* 1: 215-221.

Pritsos C.A, Sartorelli A.C. 1986. Generation of reactive oxygen radicals through bioactivation of mitomycin antibiotics. *Cancer Res.* 46: 3528-3532.

Qi Chen, R. Chao, Hongsheng C, Xuerui H, Huifang Y, Shufeng Z, Wenlie P., Anlong X. 2004. Antitumor and neurotoxic effects of novel harmaline derivatives and structure-activity relationship analysis. *Int. J. Cancer.* 114: 675-682.

Remsen J.F., Cerutti P.A. 1979. Inhibition of DNA-repair and DNA synthesis by harman in human alveolar tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86: 124-129.

Rigger M.G. 1981. Glossary of genetics classical and molecular. Springer Verlag. Alemania. pp. 339-345.

Rink S.M., Limpman R., Alley S.C., Hopkins P.B., and Tomasz M. 1996. Bending of DNA by the mitomycin C-induced, GpG intrastrand cross-link. *Chem. Res. Toxicol.* 9: 382-389.

Robertson H.A. 1980. Harmaline-induced tremor: The benzodiazepine receptor as a site of action. *Eur. J. Pharmac.* 67: 129-132.

Roca J. 2003. Topoisomerasas de AND de tipo II. *Investigación y ciencia.* 327: 40-49.

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

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

Sjolund B., Bjorklund A., Wiklund L. 1977. The indolaminergic innervation of the inferior olive. 2. Relation to harmalino-induced tremor. *Brain Res.* 131: 23-37.

Sobhani, M.A., Ebrahimi, S.A., Mahmoudian, M. 2002. An In vitro evaluation of human DNA topoisomerase I inhibition by *Peganum harmala* L. seeds extract its  $\beta$ -carboline alkaloids. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 1: 19-23.

Song Y., Djohan K., Jian W., Yu D., Jinao D., Wang J. H., Qi R.Z. 2004. Specific of cyclin-dependent kinases and cell proliferation by harmine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317: 128-132.

Sotelo C., Gotow T., Wassef M. 1986. Localization of glutamic-acid-decarboxylase-immunoreactive axon terminals in the inferior olive of the rat, with special emphasis on anatomical relations between GABAergic synapses and dendrodendritic gap junctions. *J. Comp. Neurol.* 252: 32-50.

Taira Z., Kanzawas S., Dohara C., Ishida S., Matsumoto M., Sakiya Y. 1997. Intercalation of six beta-carboline derivatives into DNA. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health* 43: 83-91.

Tice R.R., Hayashi M., MacGregor J.T., Anderson D., Blakey D.H., Holden H.E., Kirsch-Volders M. Jr., Oleson F.B., Pacchierotti F., Preston R.J., Romagna F., Shimada H., Sutou S., Vannier B. 1994. Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test. *Mutat. Res.* 3122: 305-312.

Tweedie D.J., Prough R.A., Burke M.D. 1988. Effects of induction on the metabolism and cytochrome P-450 binding of harman and other  $\beta$ -carbolines. *Xenobiotica* 18: 785-796.

Uezono T., Maruyama W., Matsubara K., Naoi M., Shimizu K., Saito O., Ogawa K., Mizukami H., Hayase N., Shiono H. 2001. Norharman, an indoleamine-derived beta-carboline, but not Trp-P-2, a gamma-carboline, induces apoptotic cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Neural. Transm.* 108: 943-953.

Wakabayashi K., Totsuka Y., Fukutome K., Oguri A., Ushiyama H., Sugimura T. 1997. Human exposure to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines and comutagenic  $\beta$ -carbolines. *Mutat. Res.* 376: 253-259.



Wang J. C. 1996. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 635-692.

Wang J. C. 1998. Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Quart. Rev. Biophys.* 31: 107-144.

Wang X.H., Wang H, He A.G. 1996. Study on the antitumor effect of the total harmala. *J. China Med. Univ.* 25: 240-242.

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

Willie A.H. 1980. Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-306.

[www.amazon.com](http://www.amazon.com)

[www.ansci.cornell.edu](http://www.ansci.cornell.edu)

[www.atcc.org](http://www.atcc.org)

[www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)

Xie Y., Luo T.X. 1998. Study of tah-induced apoptosis in HeLa cells. *Tumor* 18: 131-133.

Xue K.X., Wang S., Ma G.J., Zhou P., Wu P.Q., Zhang R.F. 1992. Micronucleus formation in peripheral-blood lymphocytes from smokers and the influence of alcohol- and tea-drinking habits. *Int. J. Cancer* 50: 702-705.

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

Zheng W., Wang S., Barnes L.F., Guan Y., Louis E.D. 2000. Determination of harmine and harmaline in human blood using reversed-phased high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Anal. Biochem.* 279: 125-9.



Tabla 1. Distribución y número de MN en células BN, frecuencia de MN, distribución y frecuencia de acuerdo al número de núcleos, porcentaje de células binucleadas e índice de proliferación celular obtenido en el ensayo de MN *in Vitro* con diferentes concentraciones de dos alcaloides beta-carbolinos.

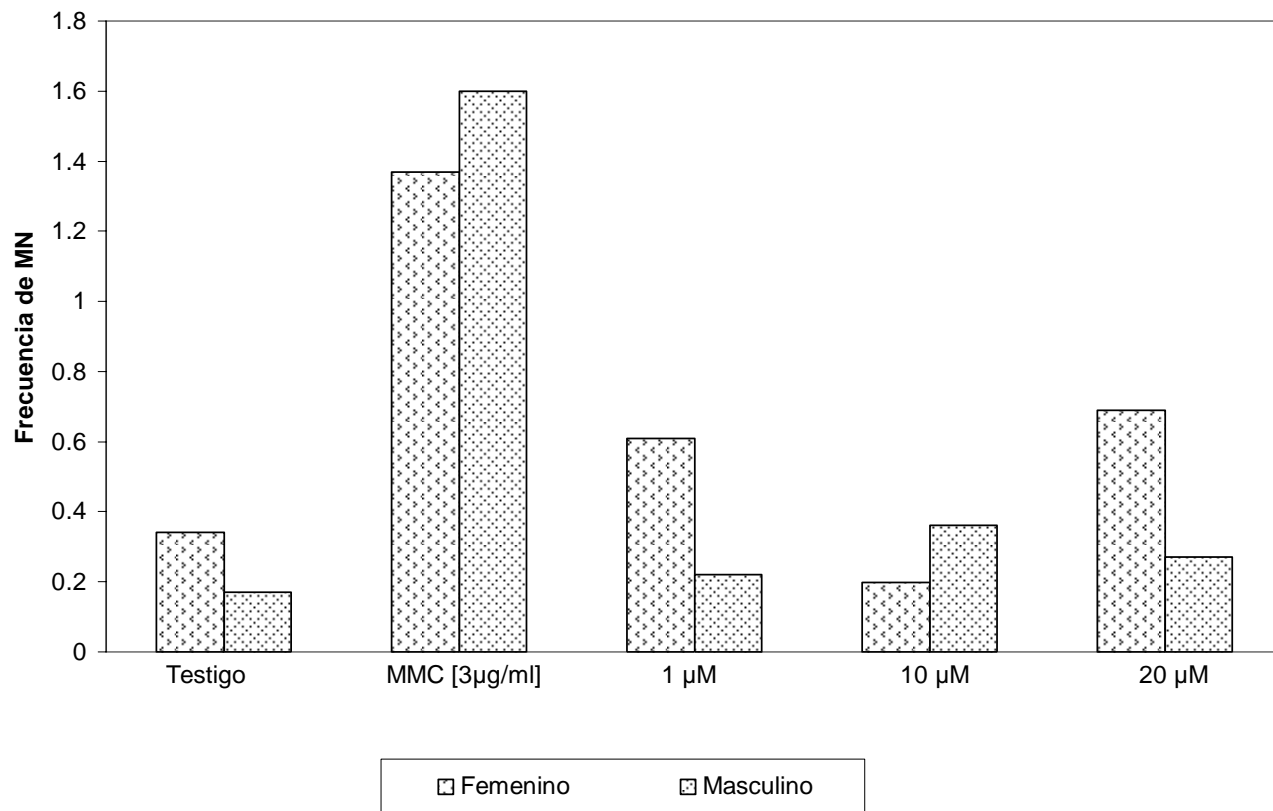
Donador/ Sexo	Compuesto/ Concentración [μM]	Distribución de MN en células Binucleadas			Total de células BN	Frecuencia de MN y estadística <sup>a</sup>	Distribución de células de acuerdo al número de núcleos.					Total de células	Porcenta- je de células binuclea- das	CBPI
		0	1	2			Mononu- cleadas	Binú- cleadas	Trinu- cleadas	Tetranu- cleadas	Pentanu- cleadas			
<b>Armiño</b>														
F	Testigo	4141	12	2	4155	0.0034	1127	4155	212	298	3	5795	0.72	1.95
	MMC [3μg/ml]	4028	56	0	4084	0.014	1198	4084	187	200	0	5669	0.72	1.89
	1	4085	23	2	4110	0.0061	1020	4110	271	357	5	5763	0.71	2.00
	10	4049	8	0	4057	0.002	762	4057	65	52	0	4936	0.82	1.88
	20	714	5	0	719	0.0069	1636	719	0	0	0	2355	0.3	1.30
	40	1	0	0	1		537	1	0	0	0	538	0.002	1.00
M	Testigo	4121	7	0	4128	0.0017	1003	4128	263	558	1	5953	0.69	2.06
	MMC [3μg/ml]	4003	65	0	4068	0.016	1229	4068	169	121	0	5587	0.73	1.85
	1	4025	6	3	4034	0.0022	1123	4034	350	442	1	5950	0.68	2.02
	10	4145	15	0	4160	0.0036	1098	4160	245	228	5	5736	0.72	1.93
	20	1866	5	0	1871	0.0027	1258	1871	0	0	0	3129	0.60	1.60
	40	7	0	0	7		1594	7	0	0	0	1601	0.004	1.00
<b>Harmalino</b>														
F	Testigo	3974	26	0	4000	0.0065	971	4000	906	727	0	6604	0.61	2.21
	MMC [3μg/ml]	3936	64	0	4000	0.016	1246	4000	1332	1000	0	7578	0.53	2.27
	0.858	4045	16	0	4061	0.0039	932	4061	305	222	0	5520	0.74	1.97
	8.58	2138	22	2	2162	0.011	1028	2162	41	45	0	3276	0.66	1.73
	17.167	1784	15	0	1799	0.0083	857	1799	33	21	0	2710	0.66	1.71
	34.33	1292	3	0	1295	0.0023	532	1295	19	42	0	1888	0.68	1.77
M	Testigo	3979	21	0	4000	0.0052	1247	4000	287	179	0	5713	0.70	1.89
	MMC [3μg/ml]	3941	59	0	4000	0.015	755	4000	467	197	0	5419	0.74	2.02
	0.858	4137	10	0	4147	0.0024	900	4147	152	134	0	5333	0.78	1.91
	8.58	2568	16	0	2584	0.0062	1646	2584	57	72	0	4359	0.59	1.67
	17.167	1511	12	0	1523	0.0079	646	1523	48	17	0	2234	0.68	1.75
	34.33	1152	9	0	1161	0.0077	591	1161	64	18	0	1834	0.63	1.73

<sup>a</sup> Tablas de 2x2, prueba exacta de Fisher P ≤ 0.05

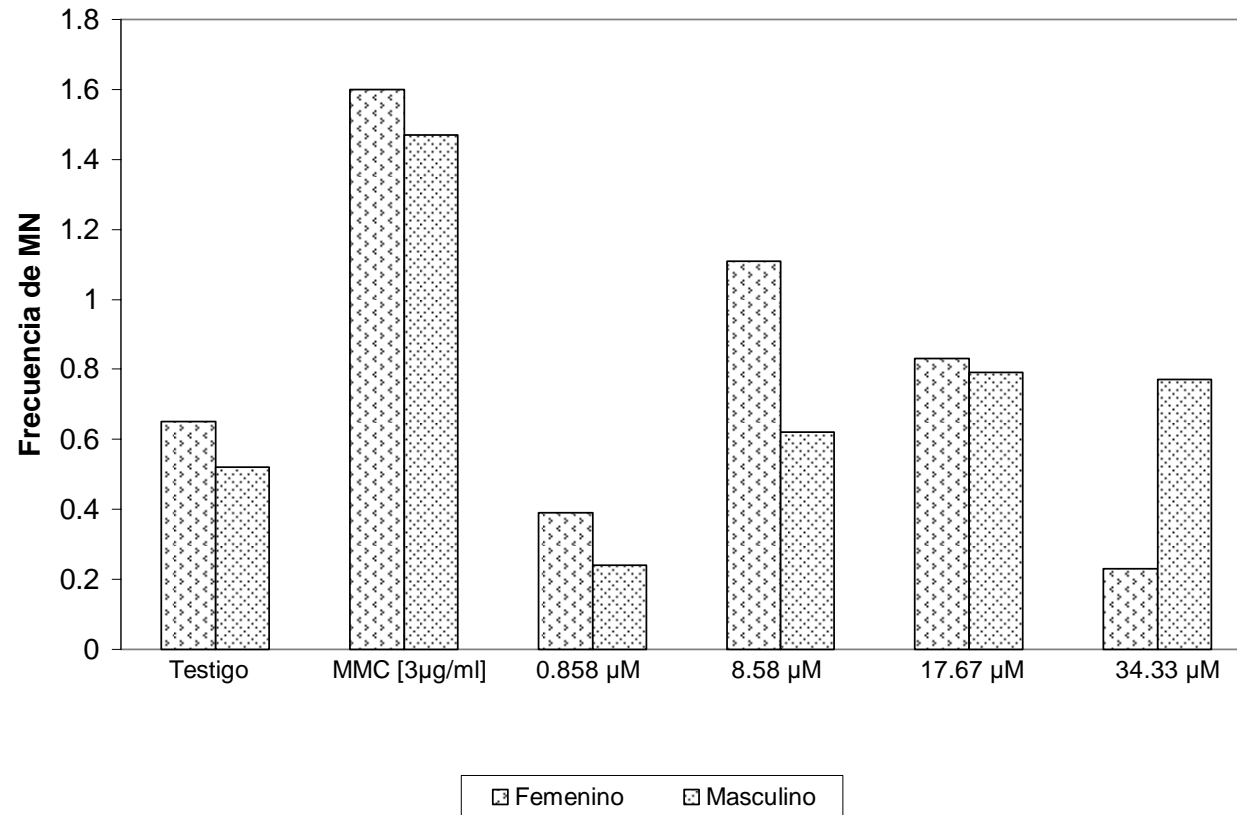
Tabla 2. Distribución, número y frecuencia de células apoptóticas y necróticas en el ensayo de MN *in vitro* obtenidos en las concentraciones más altas del beta carbolino harmino.

Donador	Harmino	Células apoptóticas	Frecuencia	Células necróticas	Frecuencia
F	20 $\mu$ M	57	0.024	585	0.25
	40 $\mu$ M	86	0.16	298	0.55
M					
	20 $\mu$ M	62	0.019	1588	0.51
	40 $\mu$ M	210	0.13	588	0.37

Gráfica 1. Frecuencia de MN obtenidos en células binucleadas al tratar linfocitos humanos *in vitro* con harmino



Gráfica 2. Frecuencia de MN en células binucleadas obtenidos al tratar linfocitos humanos *in vitro* con harmalino



Gráfica 3. Índice de proliferación celular obtenido al tratar linfocitos humanos *in vitro* con dos alcaloides beta carbolinos

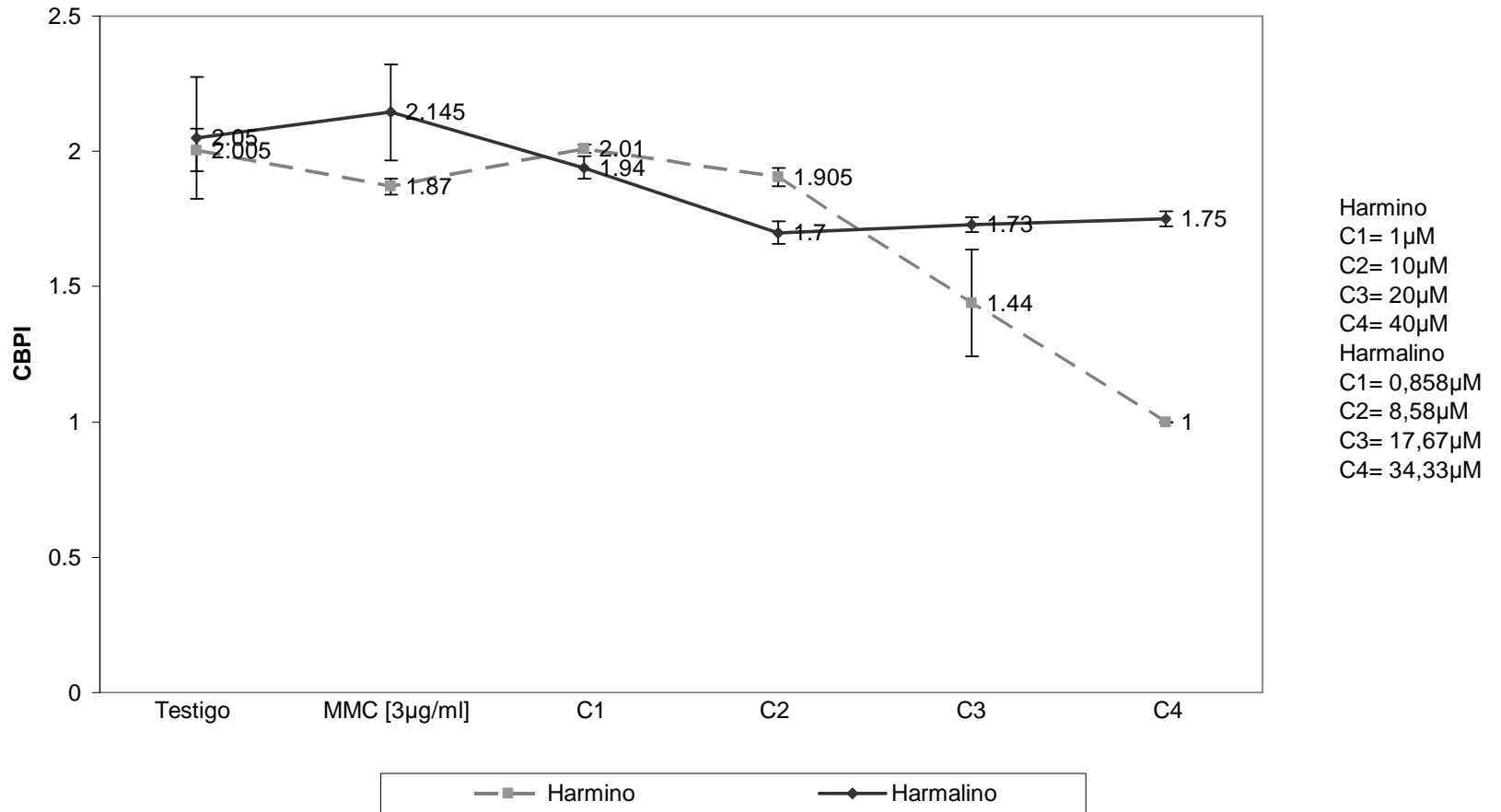




Tabla 3. Viabilidad obtenida al tratar diferentes líneas celulares malignas con dos alcaloides beta carbolinos *in vitro*.

<b>HARMINO</b>						
Absorbancia a 480 nm						
Línea celular humana	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4	Promedio	Desviación estándar
Testigo fibroblastos						
Testigo	2.125	2.102	2.132	2.081	2.11	0.02
20 $\mu$ M	2.037	1.741	1.824	1.950	1.89	0.13
40 $\mu$ M	1.053	0.919	0.806	1.815	1.15	0.46
HeLa						
Testigo	2.345	2.421	2.498	2.501	2.44	0.07
20 $\mu$ M	2.256	2.194	2.17	2.225	2.21	0.03
40 $\mu$ M	2.586	2.319	2.396	2.452	2.44	0.11
C33						
Testigo	1.555	1.855	1.729	1.985	1.79	0.18
20 $\mu$ M	1.076	1.216	1.228	1.216	1.84	0.07
40 $\mu$ M	0.631	0.718	1.036	1.030	0.85	0.21
SW480						
Testigo	2.307	2.379	2.488	2.247	2.35	0.10
20 $\mu$ M	2.426	2.442	2.480	2.488	2.45	0.03
40 $\mu$ M	2.372	2.466	2.327	2.424	2.4	0.06
<b>HARMALINO</b>						
Testigo fibroblastos						
Testigo	2.036	2.137	2.103	2.095	2.09	0.04
20 $\mu$ M	0.664	0.612	0.652	0.754	0.517	0.06
40 $\mu$ M	0.505	0.513	0.537	0.512	0.517	0.01
HeLa						
Testigo	2.513	2.509	2.538	2.541	2.52	0.02
20 $\mu$ M	1.972	2.139	1.999	1.444	1.89	0.30
40 $\mu$ M	0.591	0.572	0.627	0.570	0.59	0.03
C33						
Testigo	1.640	1.588	1.546	1.795	1.64	0.11
20 $\mu$ M	0.548	0.589	0.611	0.565	0.58	0.03
40 $\mu$ M	0.552	0.569	0.563	0.562	0.56	0.01
SW480						
Testigo	2.500	2.476	2.401	2.240	2.40	0.12
20 $\mu$ M	2.001	2.056	2.171	2.005	2.06	0.08
40 $\mu$ M	0.899	1.037	1.307	0.894	1.03	0.19

Gráfica 4. Viabilidad en diferentes líneas celulares cancerígenas probando dos alcaloides beta carbolinos harmino y harmalino.

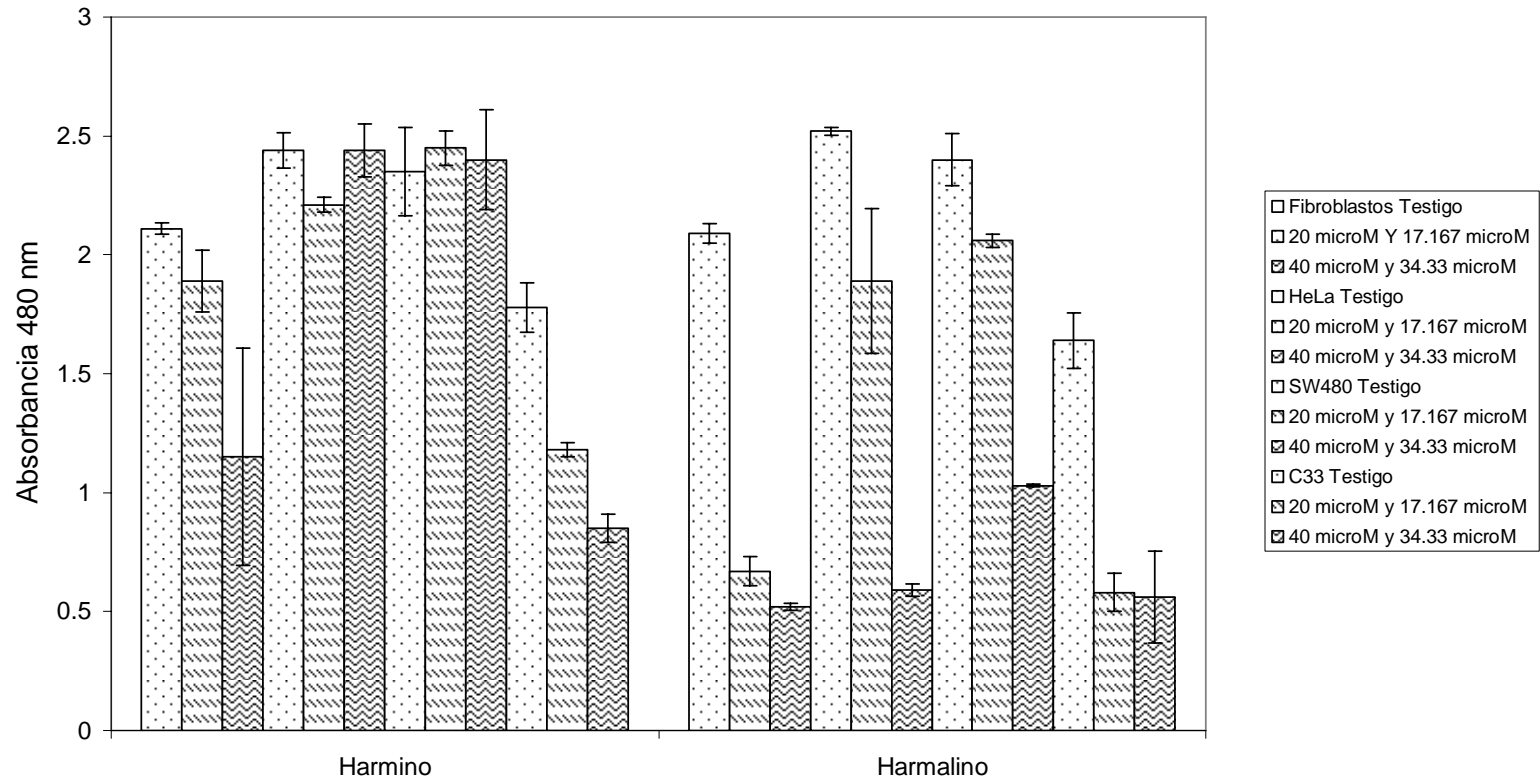
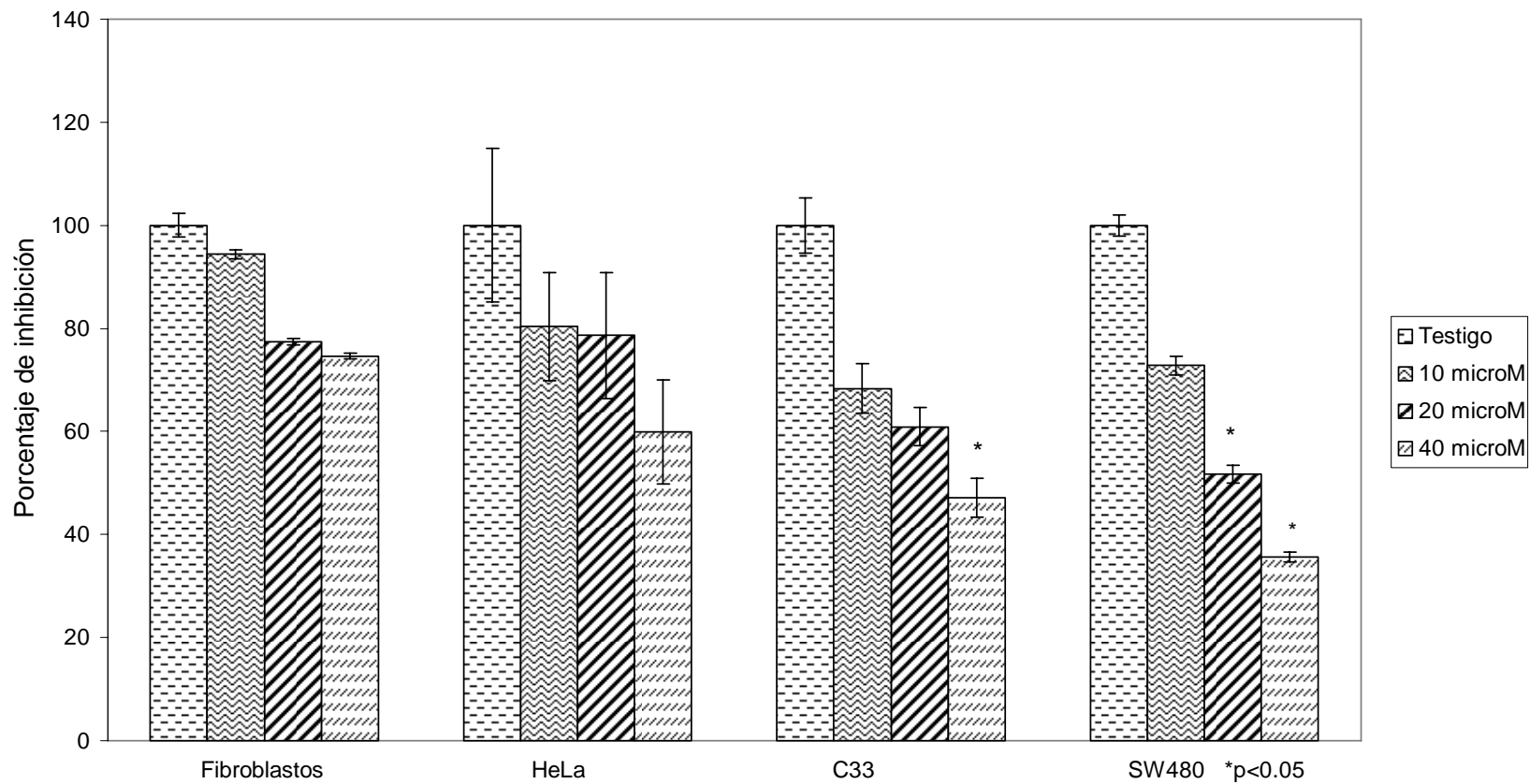


Tabla 4 Resultados del ensayo de formación de colonias en diferentes líneas celulares expuestas a harmino.

Línea celular humana	Concentración [μM]	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Promedio	Desviación estándar	Porcentaje de inhibición
Número de colonias por caja							
<b>Fibroblastos</b>	Testigo	12	14	9.5	11.83	2.25	0
	10	11.25	12	10.25	11.16	0.88	94.37
	20	9.75	8.5	9.25	9.17	0.63	77.46
	40	9.5	8.5	8.5	8.83	0.58	74.64
<b>HeLa</b>	Testigo	18	36.25	48	34.1	14.89	0
	10	15.5	30.5	36	27.33	10.51	80.35
	20	13	30.5	37	26.83	12.21	78.62
	40	8.75	27.25	25	20.33	10.09	59.95
<b>C33</b>	Testigo	33.25	24.5	23.5	27.08	5.36	0
	10	24	15.25	16.3	18.52	4.79	68.31
	20	20.75	14.25	14.5	16.5	3.68	60.92
	40	17	9.75	11.5	12.75	3.78	47.08
<b>SW480</b>	Testigo	26	26	22.5	24.83	2.02	0
	10	19.26	16	19	18.09	1.81	72.82
	20	11.5	12.25	14.75	12.83	1.70	51.68
	40	7.75	9.25	9.5	8.83	0.95	35.57

Gráfica 5. Porcentajes de inhibición en diferentes líneas celulares cancerígenas inducidas por el beta carbolino harmino

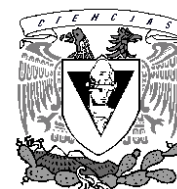


## Anexo 1. Cuestionario y carta de consentimiento.



**Cuestionario que se aplicó a los individuos del proyecto de investigación:** Evaluación de la actividad genotóxica y citostática de los alcaloides beta carbolinos harmino y harmalino en dos ensayos de células humanas *in vitro*.

**Laboratorio de Genética, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM.**



Apellido paterno:		Apellido materno:		Nombre:	
Estudiante de la carrera:					
Facultad:					
Estado Civil:					
Dirección Particular:					
Teléfono trabajo:					
Teléfono casa:					
E-mail:					
Edad:					
Sexo:					
Estatura		cm	Peso:		Kg
Medicamentos que actualmente está tomando:					
Padecimiento actual:					
1.-¿Toma café?				Si	No
Si toma ¿Cuántas tazas al día?					
2.- ¿Toma Té?				Si	No
Si toma ¿Cuántas tazas al día?					
3.- Ingiere bebidas alcohólicas?				Si	No
Si toma ¿Con que frecuencia?					
4.-¿Fuma?				Si	No
Si fuma ¿Cuántos cigarros al día?					
Si no fuma ¿Ha fumado en alguna época de su vida?				Si	No
Cuando fumaba ¿Cuántos cigarrillos al día?					
¿Cuándo dejo de fumar?					
5.- ¿Qué come normalmente?					
Desayuno:					
Almuerzo:					
Comida:					
Cena:					
6.-¿Consume alguna droga?				Si	No
Si consume alguna droga ¿Cuál?					
Si la consume ¿Con que frecuencia?					
7.- ¿Toma algún antidepresivo?					
Si toma ¿Con que frecuencia?				Si	No



## **CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN.**

Lugar y Fecha

Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado:

El objetivo del estudio es:

Se me ha explicado que mi participación consistirá en:

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:

El Investigador Responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre la investigación a realizar, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca del procedimiento que se llevará a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la relación con el laboratorio.

El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque ésta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y firma del donante

Nombre y firma del Investigador Responsable.

Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio:

Testigos

Formato modificado de la carta de consentimiento del ISSSTE ([www.salud.gob.mx/](http://www.salud.gob.mx/))

## Anexo 2. Validación del ensayo de micronúcleos.

Existen diversos factores que pueden influir en la frecuencia basal de MN; la edad ha sido ampliamente estudiada, relacionándose mayor edad con mayor índice de MN (Bonassi *et al.*, 2001; Migliore *et al.*, 1991; Bukvic *et al.*, 2001). En el caso del análisis de género, las mujeres presentan una frecuencia basal superior a la de los hombres y el número de MN incrementa cuando se superan los 35 años de edad. La presencia de homocisteína en plasma, el déficit de folato y de vitamina B12 conducen a un incremento en la frecuencia basal de MN (Fenech, 1993; Fenech *et al.*, 1999; Fenech y Crott, 2002) (Fig. 5).

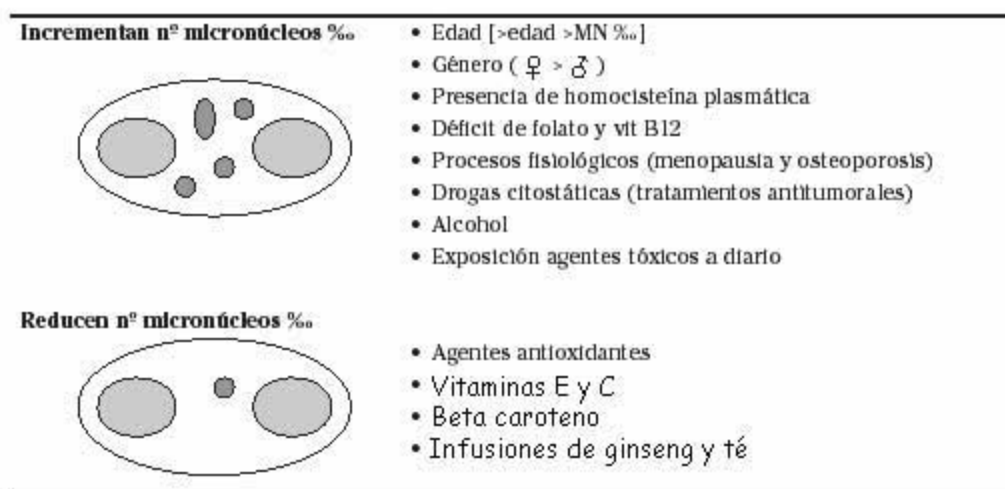


Figura 5. Factores que modifican el número de micronúcleos en cultivos de células humanas.

En el caso de las mujeres, la entrada en la menopausia y el posible desarrollo de osteoporosis se relacionan con un mayor índice de MN (Landi *et al.*, 2000). Otros estudios relacionan un descenso del número de MN al suplementar la dieta con agentes antioxidantes como la vitamina E, la vitamina C, el b-caroteno, ginseng e incluso infusiones de té verde (Xue *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2004).

Con el propósito de valorar si el ensayo de MN funciona de forma adecuada se emplea un control positivo, tal como la Mitomicina C (MMC) (Fig. 6) que es un antibiótico que fue aislado de *Streptomyces caespitosus* por el grupo de Hata en 1955. Tiene propiedades citotóxicas, antibacterianas y antitumorales es usado en quimioterapia para el tratamiento de

adenocarcinomas, leucemia mielocítica crónica y en la enfermedad de Hodgkin; también se emplea después de la irradiación o de la cirugía de sarcomas, epitelomas y carcinomas. Su actividad biológica está relacionada fundamentalmente con su propensión a unirse covalentemente al DNA y formar enlaces cruzados entre las dos cadenas complementarias. A nivel molecular actúa como un agente alquilante que forma aductos con el nitrógeno 2 de la guanina, enlaces intracatenarios y enlaces intercatenarios (Rink *et al.*, 1996). La reacción es específica de secuencia: la MMC alquila preferentemente guaninas en secuencias CpG, que pueden convertirse en un enlace cruzado intercatenario (Kumar *et al.*, 1992; Palom *et al.*, 2002). Dentro de la célula, la MMC sufre un ciclo de oxidación y reducción, obteniéndose especies reactivas capaces de producir radicales de oxígeno (Pritsos y Sartorelli, 1986). Existen evidencias de que la citotoxicidad de la MMC es debida principalmente a la formación de aductos en el DNA más que por los radicales de oxígeno (Palom *et al.*, 2002).

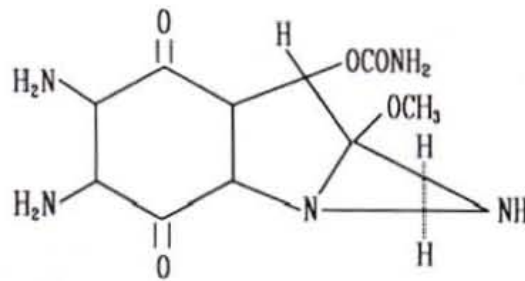


Figura 6. Estructura de la MMC.



### Anexo 3. Características de las líneas celulares

Los fibroblastos de la cepa Ccd-18 lu derivan de tejido conjuntivo de pulmón son un tipo celular que sintetiza y mantiene la matriz extracelular del tejido de muchos animales. Estas células proporcionan una estructura en forma de entramado ([estroma](#)) a muy diversos tejidos y juegan un papel crucial en la curación de heridas, siendo las células más comunes del [tejido conectivo](#). Se derivan de células primitivas mesenquimales y pluripotenciales. El fibroblasto sintetiza [colágeno](#) y mucopolisacáridos de la sustancia amorfa. Migra y prolifera durante la cicatrización de heridas. Cuando el fibroblasto disminuye su actividad se le denomina fibrocito, el cual no puede dividirse. La restitución del tejido conectivo se efectúa mediante el crecimiento de fibroblastos jóvenes. Los fibrocitos son fusiformes con pocas prolongaciones, núcleo pequeño, alargado y más denso que el de los fibroblastos. Los fibroblastos son morfológicamente heterogéneos, con diversas apariencias dependiendo de su localización y actividad (Alberts *et al.*, 2002).

Las células HeLa proceden de Henrietta Lacks, una mujer afroamericana de 31 años. Las células son positivas a la tinción con queratina por inmunoperoxidasa. Se ha reportado que tienen el virus 18 del papiloma humano (HPV-18). Tiene una expresión baja de p53 y valores normales de pRB (supresor de retinoblastoma) ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)).

La línea celular C-33.A es una de las series de líneas obtenida mediante biopsias de cáncer cervical de N. Auersperg, mujer de 66 años. La línea exhibe inicialmente un cariotipo hipodiploide. Con el paso continuo se observa su inestabilidad cariológica. La proteína de retinoblastoma (pRB) está presente pero en tamaño anormal. Tiene una expresión elevada de p53 y una mutación puntual en el codón 273 resultando en una sustitución de una arginina por una cisteína (R por C). Las células son negativas para el virus del papiloma humano de DNA y RNA ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)).

La línea celular SW480 fue aislada de un nódulo linfático metastático de un hombre caucásico de 50 años, establecida como un adenocarcinoma primario de colon un año después. Es negativa a CSAp y al antígeno 3 de colon.

Las células son positivas a la tinción con queratina por inmunoperoxidasa. La mutación puntual de una G por una A en el codon 273 del gen p53 da como resultado una sustitución de una arginina por una histidina y una mutación en el codon 309 resultando en una sustitución de una prolina por una serina. Las células expresan niveles elevados de la proteína p53. Mostró ser positiva para expresar los oncogenes c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, myb, sys y fos. La expresión del oncogen N-myc no fue detectada. La matrilisina, una metaloproteínasa asociada a la invasión tumorigénica no es expresada por la línea celular. Se ha reportado que las células producen GM-CFS, esta línea tiene mutado el codon 12 en el protooncogen, y puede ser usada como control positivo para los ensayos de mutación de este codon mediante PCR. El cultivo celular fue donado a la Colección Americana de Tipos de Cultivo en Noviembre de 1978 por Leibovitz ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)).