UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Área Análises Clínicas

Metabolismo de triptofano em melanomas: O que dizem as células do microambiente?

Renan Orsati Clara

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Ana Campa

São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Área Análises Clínicas

Metabolismo de triptofano em melanomas: O que dizem as células do microambiente?

Renan Orsati Clara

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Ana Campa

São Paulo

Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Clara, Renan Orsati C591m Metabolismo de triptofano em melanomas : O que dizem as células do microambiente? / Renan Orsati Clara. -- São Paulo, 2015. 181p. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Orientador: Campa, Ana 1. Bioquímica clínica 2. Química clínica I. T. II. Campa, Ana, orientador. 615.0756 CDD Renan Orsati Clara

Metabolismo de triptofano em melanomas: O que dizem as células do

microambiente?

Comissão Julgadora da

Tese para obtenção de grau de Doutor

Profa. Dra. Ana Campa

Orientador/Presidente

1° examinador

2° examinador

3° examinador

4° examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2015.

"Se, a princípio, a idéia não é absurda, então não há esperança pra ela."

A. Einstein

"You see I know change I see change I embody change All we do is change Yeah, I know change We are born to change We sometimes regard it as a metaphor That reflects the way things ought to be In fact change takes time It exceeds all expectations It requires both now and then See although the players change The song remains the same And the truth is You gotta have the balls to change" (Vinnie Jones – Change)

DEDICATÓRIA

Esse trabalho é dedicado a dois seres humanos que se misturaram em nome de algo mais nobre do que o puro desejo e o mais forte instinto humano, que me trouxeram ao mundo dos Homens e me criaram, que me lapidaram e me permitiram.

Que me ensinaram que a pura liberdade mora dentro de um frasco de disciplina e que a vida é abalizada no mais íntimo dos sonhos.

A vocês, meus pais Manuel e Iva, de tudo fica o exemplo e a amizade, e é a vós que dedico tudo o que eu puder retribuir ao mundo que me

permitiram nascer.

AGRADECIMENTOS

Ao criador, que dentre tudo, me permitiu ver a brisa de uma tarde de outono levar uma folha amarelada de um galho seco. Que me permitiu, no inverno da vida, sentir o calor do amor e da amizade. Que no verão me sacudiu com desejos intermináveis e que na primavera me fez descobrir os seus segredos. Sem sua Obra não haveria ciência.

A minha orientadora, Profa. Ana Campa. Pela presença constante, pelo olhar profundo, que tudo vê. Pelas observações únicas que me fizeram admirá-la um pouco mais a cada dia dessa longa viagem e que me incitaram a realizar mais e mais para ter a oportunidade de sentar ao seu lado e discutir ciência. Pela força expressa em docilidade e por mostrar que o caminho a ser percorrido vai muito além do que um jovem estudante é ainda capaz de ver. A quem eu devo por ter me aceitado de olhos vendados sem que me conhecesse e por ter-me dito de sua sala inacabáveis vezes: "Foco, Renan". É a você que entrego com orgulho essa tese.

Aos meus colegas jovens cientistas do Laboratório de Bioquímica Clínica da FCF-USP. Aos que contestei por me engrandecerem e me ensinarem que ciência é senão um eterno confronto de valores de um determinado tempo da História Humana. À Dra Ana Carolina Ramos Moreno que me ensinou cultura celular como um samurai ensina a nobre arte aos seus pupilos. Aos que mais se aproximaram dos meus valores pessoais e me engrandeceram com nobres amizades: Sika, Luzi, Branqs, Ari e Janis. Ari e Janis, em especial a vocês que me fizeram forte. Que fizeram ecoar sobre o meu ser o exemplo do que é um trabalho em grupo completamente impecável. A vocês entrego meu escudo e minha espada, onde quer que evoquem meu nome. Branqs, também não te esqueço: não fosse você salvando o fim dessa história, minhas conclusões não seriam tão charmosas!

A técnica-mãe-amiga-salva-vidas Silene Migliorini, que aceitou meus limites intelectuais com prestações de contas, burocracias e que, não fosse seu apoio, a FAPESP já teria cortado minha bolsa logo no início do aceite! A todas as vezes que você me viu errar, sorriu, me ensinou e dividiu suas sobremesas comigo.

Aos colegas estudantes de todo o Departamento de Análises Clínicas, em especial ao amigo Renato Massaro, que colocou um guarda-chuva sobre a minha cabeça num dia de chuva e dividiu sua vida comigo. Você me fez crescer muito, meu amigo. E claro, à Hadassa, que com sua geminiana espontaneidade me viu rir e chorar. Por um mundo com mais pessoas como vocês. Aos funcionários do Departamento e de toda a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em especial à Renata Albuquerque, pela paciência com as intermináveis análises de citometria de fluxo e por avaliar meus resultados sobre todas as óticas. Sua paciência e precisão é que permitiram que esse estudo fosse realizado. Ao café da Claudinha, às moças da limpeza e todos aqueles que mantém a estrutura impecável de nossa instituição.

A todos os pesquisadores colaboradores diretos: ao Prof. Ernani Pinto, por abrir as portas de seu laboratório; ao Prof Jair Chagas, por me re-aceitar em seu laboratório; o Prof. Peter Oefner por aceitar em participar desse estudo e me permitir ver o mundo sob outra ótica. À admirável Katja Dettmer, que me ensinou que química analítica não tem fronteiras. A todos os estudantes do Instituto de Gênomica Funcional em Regensburg, em especial às *blond girls* Nadine Assman, Nadine Nurenberger e Franziska Vogl e à querida amiga Sophie Schirmer. Ao grupo do Prof. Barbuto por ter me direcionado nos protocolos de diferenciação celular. Ao Dr. João Duprat por aceitar colaborar nesse estudo e permitir que aprofundemos o conhecimento sobre o metabolimo do microambiente. Agradeço pelo movimento de todo o grupo do Núcleo do Câncer de Pele do AC Camargo Cancer Center pela disposição e movimentação para que esse projeto fosse realizado.

Aos meus irmãos, Raquel, Lívia e Vítor por me amarem, me respeitarem e por serem as pessoas que mais quero ter perto na minha vida: sem vocês eu nada seria. Aos meus amigos pesquisadores respeitáveis que fizeram essa jornada mais do que deliciosa: Dra. Vanessa Gonçalves, Dra. Letícia Novaes, Dr. Thomas Probst, Dra. Borislawa Probst e Dra. Francine Goeldner e Dra. Fernanda Checchinato. Aos meus eternos amigos-irmãos Tales, Rachel, Daniela e Adriana. À Dra. Simone por me olhar por dentro e num dia de dor, enquanto lágrimas escorriam, ter sorrido e dito: "nós vamos sair dessa". E nós saímos. À Marcela por poetizar a minha existência. Aos meus amigos de escola Braga, Marisa, Mariana e João... vocês tem que estar por perto quando eu for velhinho! Ao Raul Nascimento por me lembrar da criança que habita em mim e por ter me dado a oportunidade de sentir proteção. À Mila, à Mel e ao Hades por olharem nos meus olhos e me fazerem ver.

Agradeço o apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo processo (2010/18477-0) e demais agências de fomento CNPq, pela bolsa do programa Ciência sem Fronteiras (CsF) e CAPES.

A todos que não foram citados mas que de algum modo tocaram meu coração.

SUMÁRIO

1.0. INTRODUÇÃO1
1.1. Metabolismo do triptofano1
1.2. Metabolismo do triptofano e câncer7
1.3. Melanomas e linhagens celulares12
1.4. Metabolismo do triptofano na fisiologia da pele e na fisiopatologia do
melanoma15
2.0. OBJETIVOS
3.0. MATERIAIS E MÉTODOS20
3.1. Condições de cultura celular20
3.1.1. Linhagens humanas de melanoma e de células primárias da
pele (fibroblastos e melanócitos)20
3.1.2. Células imunológicas de sangue periférico22
3.2. Diferenciação de monócitos de sangue periférico em macrófagos
(MDM-1 e MDM-2a) e em células dendríticas (imaturas e maduras, iDC e
mDC)24
3.2.1. Desenho experimental34
3.3. Extração de metabólitos34
3.3.1. da cultura das linhagens humanas de melanoma e de células
primárias da pele (fibroblastos e melanócitos)34
3.3.2. da cultura de células imunológicas35
3.3.3. Das amostras clínicas de melanoma36
3.4. Instrumentação analítica para estudo do metabolismo de
triptofano37
3.4.1. Em linhagens humanas de melanoma e de células primárias
da pele (fibroblastos e melanócitos)37
3.4.2. Em células imunológicas e amostras clínicas40

3.5. Comitê de ética em pesquisa42
3.6. Análise Estatística43
4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO43
CAPÍTULO 1. Estudo do metabolismo de Trp em linhagens tumorais de
melanoma humano e em células normais da pele44
4.1. Metabolismo de Trp e o efeito da adição de IFN-γ em melanomas e
celulas normais da pele44
4.2. Efeito da adição de 1-DL-MT sobre melanomas e células normais da
4.3. Efeito dos enantiômeros de 1-MT, 1-D-MT e 1-L-MT, no
metabolismo de Trp em melanoma SK-MEL-19 e em fibroblastos dérmicos65
CAPÍTULO 2. Estudo do metabolismo de Trp em células imunológicas68
4.4. Metabolismo basal de Trp e o efeito da adição de IFN-γ em células
imunológicas
4.5. Metabolismo de Trp em amostras clínicas84
5.0. CONCLUSÕES
6.0. MATERIAL SUPLEMENTAR90
6.1. Quantificação de aminoácidos em meio de cultura de UACC-62 e SK-MEL-
29 e de glicose, piruvato e lactato em linhagens de melanoma humano90
7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS95
8.0. ANEXOS116
8.1. Tabelas Estatística dos Resultados116
8.2. Ficha do Aluno124
8.3. Artigos submetidos e publicados no período127

Lista de Abreviaturas

- 1-MT: 1-metil-triptofano
- AA: ácido antranílico
- AFMK: N1-acetil-N2-formil-5-metóxiquinuramina
- AhR: receptor aril hidrocarboneto
- AMK: *N1*-acetil-α5-metoxiquinuramina
- DMT: dimetiltriptamina
- FCS: soro fetal de bezerro
- GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
- HAA: ácido 3-hidróxi-antranílico
- HIAA-D2: ácido hidróxi-indol-acético deuterado
- HIAA: ácido hidróxi-indol-acético
- HK: 3-hidróxi-quinurenina
- IAA: ácido indolacético
- iDC: células dendríticas imaturas
- IFN-γ: interferon-gamma
- IFNGR: receptor de interferon-gamma
- IL-4: interleucina-4
- IL-6: interleucina-6
- iNOS: oxido nítrico sintase indutível
- JAK: Janus Quinase
- KA: ácido quinurênico

KYM: quinuramina

KYN: quinurenina

LPS: lipopolissacarídeo

LΦ: linfócitos

m/z: relação massa/carga

M-CSF: fator estimulador de colônias de macrófagos

MAO: mono amino oxidase

mDC: células dendríticas maduras

MDM-1 ou MФ1: macrófagos derivados de monócito subtipo 1

MDM-2 ou M Φ 2: macrófagos derivados de monócito subtipo 2a

MLT-D7: melatonina deuterada

MLT: melatonina

N: neutrófilos

NA: ácido nicotínico

NAD⁺: nicotinamida adenina dinocleotídeo

NADPH: nicotinamida adenina dinocleotídeo fosfato

NAM: nicotinamida

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: óxido nítrico

PA: ácido picolínico

PNA: acetato miristato de forbol

PHAm: fitohemaglutinina mitogênica

PI: padrão interno

QA: ácido quinolínico

SER: serotonina

SFB: soro fetal bovino

STAT1: transdutor de sinal e ativador de transcrição tipo 1

TME: triptofano metil éster

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

Trp: triptofano

TRY: triptamina

via KYN: via catabólica das quinureninas

via SER: via catabólica das serotoninas

via TRY: via catabólica das triptaminas

XA: ácido xanturênico

Lista de Figuras, Esquemas e Tabelas

Figura 1: Via catabólica das quinureninas	3
Figura 2: Via Serotoninérgica/Melatoninérgica do catabolismo de Trp	5
Figura 3: Via de biossíntese do DMT, mais conhecida como via das triptaminas (TRY)	(via 6

Figura 4: Desenho experimental para diferenciação de monócitos de sangue periférico em macrófagos (MDM1 e MDM2) e células dendríticas (iDC e mDC).....26

Figura 5: Marcação de CD68-APC intracelular em MDM-1 após 7 dias de cultivo. 27

Figura 19: Efeito de IFN- γ sobre a via das triptaminas em linhagens tumorais de melanoma humano e em células da pele (melanócitos e fibroblastos dérmicos). Em

círculos vermelhos pode-se observar as concentrações basais dos metabólitos e em quadrados azuis as concentrações dos metabólitos na presença de IFN-γ......53

Figura 21: Contaminação de Trp após adição de 1 mM de 1-MT no meio de cultura RPMI (contendo 10% SFB) utilizado nos experimentos celulares. (***, p<0,001)....57

Figura 22: Efeito de 1-MT sobre a via SER em linhagens tumorais de melanoma humano e em células da pele (melanócitos e fibroblastos dérmicos). Em círculos vermelhos pode-se observar as concentrações basais dos metabólitos e em quadrados azuis as concentrações dos metabólitos na presença de 1-MT......60

Figura 23: Efeito de 1-MT sobre a via das TRY em linhagens tumorais de melanoma humano e em células da pele (melanócitos e fibroblastos dérmicos). Em círculos vermelhos pode-se observar as concentrações basais dos metabólitos e em quadrados azuis as concentrações dos metabólitos na presença de 1-MT......60

Figura 27: E	feito de 1-D-M'	Ге 1-L-МТ s	sob o metabolismo o	do Trp em f	fibroblastos
dérmicos					66
Figura 28: E	feito de 1-D-M	T e 1-L-MT	sob o metabolismo	do Trp em	SK-MEL-
19	•••••				67

Figura 30: Via KYN em monócitos de sangue periférico humano (Mono), macrófagos derivados de monócitos (M Φ 1, M Φ 2 e M Φ 7), células dendríticas imaturas e maduras (Dim e Dm), linfócitos (L Φ) e neutrófilos (N)......70

Figura 33: Efeito de IFN-γ (quadrados azuis) e de PHA (triângulos verdes) sobre a via KYN em células imunológicas. O basal é apresentado em círculos vermelhos.....77

Figura 34: Efeito de IFN-γ (quadrados azuis) e de PHA (triângulos verdes) sobre a via SER em células imunológicas. O basal é apresentado em círculos vermelhos......82

Figura 35: Efeito de IFN-γ (quadrados azuis) e de PHA (triângulos verdes) sobre a via TRY em células imunológicas. O basal é apresentado em círculos vermelhos.....83

Figura 36: Vias catabólicas do Trp (via KYN (A), SER e TRY (B)) em uma	amostra
clínica de melanoma (cinza escuro) e um nevo normal (cinza claro)	86

Figura 37: Concentração intracelular de Trp em linhagens celulares de melanoma e
em células normais da pele. Em quadrados azuis são apresentadas as concentrações de
Trp apos tratamento com IFN-γ
Figura 38: Efeito de IFN-γ e 1-MT sob a concentração dos aminoácidos em meio de
cultura de UACC-62
Figura 39: Efeito de IFN-γ e 1-MT sob a concentração dos aminoácidos em meio de
cultura de SK-MEL-2992

Tabela 4: Parâmetros da otimização dos analitos de interesse: íon precursor	(m/z), ion
produto (m/z), fragmentor e energia de colisão (V)	41

Tabela 5: Concentração de glicose, lactato e piruvato em cultura de melanomas......93

Tabela	6:	Concentração	de	glicose,	lactato	e	piruvato	em	cultura	de	melanomas
tratados	col	m IFN-γ									93

Tabela 7: Estatística: Efeito de IFN-γ sobre o metabolismo basal de células......117

Tabela 8: Estatística: Efeito de 1-MT sobre o metabolismo basal de células......117

Tabela 14: Estatística: Efeito de IFN-γ entre células imunologicas......123

Esquema 2: Resumo dos efeitos de IFN- γ sobre o metabolismo de Trp em células normais da pele: fibroblastos e melanócitos. IFN- γ induz o catabolismo de Trp via

Esquema 8: Efeito de IFN-γ sobre o metabolismo de Trp de linfócitos. IFN-γ induz a formação de KYN, TRY e IAA, além de induzir a catálise de MLT a AFMK e AMK.

RESUMO

CLARA, R.O. Metabolismo de triptofano em melanomas: O que dizem as células do microambiente? 2015. 181f. (Tese de doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O melanoma é composto por células malignas e também por um estroma de sustentação que inclui fibroblastos, células imunológicas, endoteliais, matriz extracelular, dentre outros fatores. Assim, os tumores não são entidades independentes, eles interagem ativamente com o microambiente adjacente de forma bidirecional através de sinais moleculares que modulam o fenótipo maligno. Um dos sinais bioquímicos para desenvolvimento desse fenótipo se dá pelo catabolismo de Trp pela via das quinureninas, que gera compostos com diversas atividades biológicas, que no tumor estão envolvidas com tolerância e imunoescape e, logo, com prognóstico ruim para os pacientes. Até o presente momento apenas o consumo de Trp e a formação de um único metabólito, a quinurenina (KYN), tem sido associada a malignidade dos melanomas. A fim de ampliar e elucidar os mecanismos bioquímicos do metabolismo desse aminoácido em melanomas, estudamos mais de quinze compostos de todas as rotas catabólicas de Trp em células da pele, células imunológicas, linhagens tumorais e amostras clínicas de melanoma. De forma inédita pudemos observar que as células da pele tem maior habilidade de sintetizar KYN quando comparadas às linhagens tumorais, demonstrando que o catabolismo de Trp peritumoral pode ser responsável pelos fenômenos de imunotolerância e escape. Além disso, o metabolismo de Trp pode estar envolvido nos mecanismos de homeostasia da pele, já que especificamente essas células produzem compostos com atividade biológica nesse órgão. As células imunológicas possuem um perfil metabólico completamente diferente umas das outras: monócitos, macrófagos e dendríticas possuem maior ativação da via KYN enquanto linfócitos e neutrófilos possuem maior indução da rota que gera serotonina e melatonina. Mesmo nos diferentes fenótipos de macrófagos, M1 e M2a, foram observadas marcações especificas de metabolismo, que podem estar relacionadas às atividades anti- ou pró-tumoral dessas células no microambiente. Em amostras clínicas, apesar da principal diferença entre nevos e melanomas ser a concentração de KYN, diversas outras alterações no metabolismo de tiptofano foram observadas, o que mostra a complexa magnitude deste metabolismo na fisiopatologia da pele.

Palavras-chave: triptofano, metabolismo, melanoma, microambiente.

ABSTRACT

CLARA, R.O. Tryptophan metabolism in melanomas: What do microenvironment cells can say? 2015. 181f. (Tese de doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Melanoma is composed of malignant cells and also by a stromal support that includes fibroblasts, immune cells, endothelial cells, extracellular matrix, among other factors. Thus, tumors are not separate entities; they actively interact with the surrounding microenvironment bi-directionally through molecular signals that modulate the malignant phenotype. One of biochemical signals for the development of this phenotype occurs by Trp catabolism through kynurenine pathway, that generates compounds with diverse biological activities, which in tumors are involved with tolerance and imunoescape and therefore with poor prognosis for patients. To date only the consumption of Trp and formation of a single metabolite, kynurenine (KYN), has been associated with malignant melanomas. In order to enlarge and clarify the biochemical mechanisms of this amino acid metabolism in melanomas, we have studied more than fifteen compounds of all catabolic routes of Trp in skin cells, immune cells, tumor cell lines and clinical samples of melanoma. In an unique way we could observe that the skin cells has superior ability to synthesize KYN when compared to tumor cell lines, demonstrating that the peritumoral catabolism of Trp may be responsible for the phenomena of immune tolerance and escape. Furthermore, the Trp metabolism may be involved in skin homeostasis mechanisms, since these cells produce specific compounds with biological activity in this organ. The immune cells have a completely different metabolic profile among them: monocytes, macrophages and dendritic cells have greater KYN pathway activation, and lymphocytes and neutrophils possess greater induction of the route that generates serotonin and melatonin. Even in different macrophages phenotypes, M1 and M2a, we observed specific metabolic marks, which may be related to the anti- or pro-tumoral activity of these cells in the tumor microenvironment. In clinical samples, although the main difference between nevi and melanomas is the concentration of KYN, a range of other changes in Trp metabolism were observed, which shows the complex magnitude of this metabolism in the skin pathophysiology.

Keywords: tryptophan, metabolism, melanoma, microenvironment.

1.0. INTRODUÇÃO

1.1. O Metabolismo do Triptofano

O triptofano (Trp) é um aminoácido essencial que é utilizado para síntese protéica mas também pode ser degradado por diferentes vias catabólicas e gerar compostos com diversas atividades biológicas (Peters, 1991; King e Thomas, 2007), sendo a via das quinureninas (Via KYN) seu principal fluxo catabólico (Figura 1). Nela, o Trp é oxidado a *N*-formil-quinurenina, f-KYN, com subseqüente deformilação por arilformidases constitutivas (EC 3.5.1.9), gerando o metabólito quinurenina (KYN), o produto mais estudado da via KYN.

Duas enzimas são responsáveis pela catálise do Trp à f-KYN: a triptofano 2,3dioxigenase (TDO, 1.13.11.11), enzima constitutiva hepática e recentemente relacionada a fisiopatologia de alguns tipos de câncer (Pilotte *et al.*, 2012) e indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO, 1.13.11.52), enzima induzível em diversos tecidos e células, como as células do sistema imune. A reação enzimática catalisada por TDO e IDO se dá em uma redução eletrônica do ferro presente no grupo heme das enzimas de seu estado férrico a ferroso, o que permite a ligação do L-triptofano e de um íon superóxido (Cherayil, 2009) ao sítio enzimático com posterior oxidação do anel pirrólico, sendo considerada a reação limitante para a metabolização (Thomas, Witting e Drummond, 2008).

A KYN pode ser substrato de diferentes enzimas: quinureninase (3.7.1.3), que gera ácido antranílico (AA); quinurenina 3-monooxigenase (1.14.13.9), produzindo 3– hidróxi–quinurenina (HK); e quinurenina oxo-glutarato transaminase (2.6.1.7), que produz ácido quinurênico (KA), por transaminação irreversível da L-quinurenina (Opitz *et al.*, 2007). Ambas enzimas quinurenina oxo-glutarato transaminase (2.6.1.7) e quinureninase (3.7.1.3) podem hidrolisar HK e produzir ácido xanturênico (XA) (Gobaille *et al.*, 2008) e ácido 3-hidróxi-antranílico (HAA), respectivamente. HAA também pode ser sintetizado a partir da hidroxilação de AA por antranilato 3-monooxigenase (1.14.16.3). HAA pode formar cinavalininato (em uma reação mediada por catalase (1.11.1.6)) ou seguir a via das quinureninas e, pela enzima 3-hidroxiantranilato 3,4-dioxigenase (1.13.11.6) ser convertido em 2-amino-3-carboximuconato semialdeído (ACS), que é rearranjado não enzimaticamente a ácido quinolínico (QA), que inicia o metabolismo de nicotinamida (NAM). ACS pode também ser descarboxilado pela ACS decarboxilase (4.1.1.45) e gerar 2-aminomuconato semialdeído que é rearranjado a ácido picolínico (PA) ou é degradado a Acetil-CoA que entra no ciclo de Krebs (Peters, 1991).

Os últimos passos da via KYN são relacionados ao metabolismo de ácido nicotínico (NA) e nicotinamida (NAM) que é responsável, dentre outras moléculas, pela síntese de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺). Resumidamente, o ácido quinolínico (QA) é usado pela nicotinato-nucleotídeo difosforilase (2.4.2.19, também conhecida como quinolinato fosforibosiltransferase) para a síntese de nicotinato D-ribonucleotídeo (NrN). Entre outras reações, NrN participa da síntese de vitamina B3, o ácido nicotínico (NA), nicotinamida (NAM) e NAD⁺. Todos esses metabólitos: QA, NA e NAM podem ser usados por uma célula humana para sintetizar NAD⁺ (Moffett e Namboodiri, 2003; Keszthelyi, D., Troost, F. J. e Masclee, A. A. M., 2009).



Figura 1: Via catabólica das quinureninas.

Outra via de metabolização do Trp, é a via serotonérgica/melatoninérgica (via SER)(Figura 2). Essa via se inicia a partir da hidroxilação do Trp, e formação de 5hidróxi-triptofano pela triptofano hidroxilase-2 (1.14.16.4), com posterior descaboxilação pela dopa descarboxilase (ou aminoácidos aromáticos descarboxilase, 4.1.1.28), gerando serotonina (SER), em uma reação que utiliza vitamina B6 como cofator (Nordlind, Azmitia e Slominski, 2008). Tanto 5-hidróxi-triptofano como a SER podem sofrer ação da IDO e serem convertidos a 5-hidróxi-quinurenina e 5-hidróxiquinuramina (5-OH-KYM), respectivamente, o que demonstra que as vias KYN e SER se intercomunicam entre si.

A SER pode ser catalisada pelas enzimas monoamino oxidases, MAO [em humanos, principalmente pela MAOa mitocondrial (1.4.3.4) (Tekes, 2008)], e formar 5hidróxi-indol-acetalaldeído, que em células do sistema nervoso central encontra-se em equilíbrio com o ácido 5-hidróxi-indol-tiazolidina carboxílico [produto da condensação do 5-hidróxi-indol-acetalaldeído com uma L-cisteína (Squires et al., 2006)]. Há hipóteses de que o produto desse equilíbrio, ácido 5-hidróxi-indol-acético (HIAA), seja formado por uma aldeído oxidase I (1.2.3.1) a partir do ácido 5-hidróxi-indol-tiazolidina carboxílico (Xiang et al., 2000), porém outros grupos acreditam que essa formação se dê a partir do deslocamento do equilíbrio para 5-hidróxi-indol-acetalaldeído, por ação de uma aldeído desidrogenase tipo II (1.2.1.3) (Squires *et al.*, 2006). Como produto do 5-hidróxi-indol-acetaldeído tem-se também, 5-hidróxi-triptofol, a partir de uma óxidoredutase. O 5-hidróxi-triptofol é o metabólito de SER encontrado em menor quantidade, representando apenas 1% do turnover de SER (Keszthelyi, D., Troost, F. e Masclee, A., 2009). A formação dos dois produtos metabólicos da SER, citados acima, são intimamente dependentes da relação NAD/NADH (Tekes, 2008) já que as enzimas envolvidas utilizam essas moléculas como co-fator.

Algumas células, como os pinealócitos, são capazes de utilizar SER para a síntese de melatonina (MLT) através da rota intermediada por *N*-acetilserotonina. A SER sofre N-acetilação (pela arilalquilamina N-acetiltransferase, 2.3.1.87) seguida de uma metilação (acetilserotonina O-metiltransferase, 2.1.1.4), e forma N-acetil-5-metóxi-triptamina, a melatonina (Lerner *et al.*, 1959; Sugden, 1989). Devido a essas reações os grupos hidroxila e amina da SER são bloqueados o que torna o metabólito MLT altamente hidrofóbico (Harumi e Matsushima, 2000).



Figura 2: Via Serotoninérgica/Melatoninérgica do catabolismo de Trp.

A melatonina tem capacidade de capturar radicais de oxigênio e gerar diferentes metabólitos (Tan *et al.*, 2003). O metabólito N1-acetil-N2-formil-5-metóxiquinuramina (AFMK) é considerado o principal metabólito da melatonina, sendo obtido por reações com radicais hidroxila e oxigênio singlete, mas também pode ser produzido por catálise enzimática por mieloperoxidase de neutrófilos (1.11.2.2) (Silva *et al.*, 2005). O AFMK obtido por oxidação da MLT pode ser deformilado por uma formidase e dar origem a *N1*-acetil-α5-metoxiquinuramina (AMK) (Hirata *et al.*, 1974). Juntos, AFMK e AMK são os metabólitos da melatonina mais encontrados no sistema nervoso central. Derivados sulfatados são encontrados como metabólitos de MLT em urina.

Apesar das vias KYN e SER somadas serem responsáveis pela quase totalidade do catabolismo de Trp, uma parte minoritária do Trp pode ser convertida em dimetiltriptamina (DMT)(Figura 3). O DMT é um alcalóide indólico proveniente da descarboxilação do triptofano, formando triptamina (TRY) que é dimetilada por ataque nucleofílico em uma reação catalisado pela enzima triptamina-N-metil-transferase (INMT, 2.1.1.49) sendo a S-adenosil-metionina (SAM) a doadora de radicais metila (Jacob e Presti, 2005). Em motoneurônios de ratos, a enzima INMT é co-localizada com o receptor S1R em (Mavlyutov *et al.*, 2012), o que parece intrigante já que DMT foi proposto como um dos ligantes desse receptor (S1R) (Fontanilla *et al.*, 2009), que ainda tem funções a serem elucidadas. A TRY possui também como metabólito o ácido indolacético (IAA).



Figura 3: Via de biossíntese do DMT, mais conhecida como via das triptaminas (via TRY).

1.2. Metabolismo do triptofano e câncer

A indução do catabolismo de aminoácidos é essencial para a progressão e regulação imunológica no câncer (Cantor e Sabatini, 2012). Assim, estudos sobre o metabolismo de aminoácidos de células tumorais e estromais auxiliam a compreensão sobre os sinais envolvidos no desenvolvimento e na progressão de tumores.

Um dos exemplos mais antigos da ligação entre o aumento do catabolismo de aminoácidos e câncer é o catabolismo de Trp. Há mais de sessenta anos os metabólitos do triptofano foram correlacionados ao câncer (Boyland e Williams, 1956). Depois disso, grupos de pesquisa buscaram por metabólitos de Trp em urina e soro de pacientes com diversos tipos de tumores (Leppanen e Oka, 1963).

O impacto do consumo e depleção de Trp pela via KYN, a partir da indução de IDO em tumores, sobre células do sistema imune faz parte dos principais mecanismos de tolerância, imunoescape e progressão tumoral (Kim, Emi e Tanabe, 2007; Munn e Mellor, 2007; Swann e Smyth, 2007). IFN- γ é o principal indutor de IDO (Yasui *et al.*, 1986) e pode ser produzido por diferentes células imunológicas no microambiente tumoral (Han *et al.*, 2011; Gajewski, Schreiber e Fu, 2013). Todo este reconhecimento tem impacto no diagnóstico laboratorial e na terapêutica. O aumento da expressão e atividade de IDO e subseqüente aumento da razão KYN/Trp plasmáticos em muitos cânceres tem sido associada a um prognóstico ruim e a metástases, como por exemplo em melanomas (Weinlich, Georg *et al.*, 2007; Weinlich, G *et al.*, 2007; Ino *et al.*, 2008; Speeckaert *et al.*, 2012).

Apesar da relação KYN/Trp ser a mais descrita, outras relações entre metabólitos tem sido apresentadas com relevância para avaliação do prognóstico tumoral, a exemplo, em câncer cervical primário há um aumento das concentrações de QA e uma diminuição de KA, apontando a relação QA/KA como fator prognóstico para esse tipo de câncer (Fotopoulou *et al.*, 2011). Não só a diferente produção entre esses metabólitos, mas o direcionamento da via parece estar alterado em processos tumorais. Neurônios humanos direcionam a via KYN para a síntese de PA, enquanto células de neuroblastoma humano a direcionam para a síntese de QA (Guillemin *et al.*, 2007).

A inibição da enzima IDO tem sido considerada uma estratégia excelente para a restauração da imunidade. Estudos relatam que o tratamento quimioterápico convencional associado a inibidores de IDO, imunoterápicos, tem resultados promissores no tratamento de tumores (Muller e Scherle, 2006). De fato, diversos estudos clínicos estão sendo realizados com diferentes inibidores de IDO (em acesso ao website *clinical trials.gov* em 03.01.2015, pode-se verificar mais de 20 estudos clínicos para inibidores de IDO em andamento).

O inibidor de IDO mais utilizado, que por muito tempo foi descrito como inibidor padrão ouro é o 1-metil-DL-triptofano (1-DL-MT). Estudos demonstraram que, apesar de sua forma levógira (L-) ser um inibidor mais potente de IDO1 purificada em ensaios celulares (Loeb e Koenigsrainer, 2008), sua forma dextrógira possui maior atividade antitumoral em modelos animais, sendo mais eficaz em reverter a supressão de linfócitos T mediada por células dendríticas IDO1 positivas, e portanto foi a isoforma selecionada para estudos clínicos em humanos (Hou *et al.*, 2007). Esta aparente contradição foi parcialmente resolvida com a descrição de outra isoforma de IDO também expressa em diferentes tipos de tumor, a IDO2, (Ball *et al.*, 2009) que apresenta 43% de homologia com IDO1 e é altamente inibida pela isoforma dextrógira (D-) e não é afetada pela forma levógira. Porém, apesar da descrição de IDO2 em tumores, em vários estudos a IDO2 foi expressa sem atividade funcional (1-D-MT não foi capaz de inibir a formação de KYN), demonstrando que a principal participação na

degradação de Trp no processo tumoral e imunoescape é feita por IDO1 (Loeb e Koenigsrainer, 2008).

É importante enfatizar que IDO pode possuir outras atividades regulatórias na indução da tolerância, que independem de sua atividade catalítica (Pallotta *et al.*, 2011). Tal fato exemplifica-se no estudo do modelo *knockout* de IDO2, onde há uma forte interação genética de IDO2 com os efeitos imunomediados por IDO1 (Metz *et al.*, 2014). Já o *knockout* de IDO1 exibe um robusto fenótipo resistente a tumores de pele induzidos por acetato miristato de forbol (PMA) (Muller *et al.*, 2008), efeito não observado no *knockout* de IDO2 (Metz *et al.*, 2014).

Além da participação da isoforma IDO 2, trabalhos mais recentes também tem apontado a importância da TDO no desenvolvimento e progressão tumoral e o uso de inibidores de TDO também tem recebido forte atenção (Pilotte Luc, *et al*, 2012).

Apesar do uso de 1-D-MT em estudos clínicos, esse foi incapaz de alterar a atividade enzimática de IDO1 em sistema livre de células, e, ao contrário, demonstrou ser capaz de induzir a expressão de RNAm e da proteína IDO1 em células SKOV-3, de carcinoma de ovário. Logo, o tratamento de câncer com 1-D-MT possui efeitos transcricionais que podem promover, ao invés de suprimir, o imunoescape tumoral mediado por IDO1. Apesar de trabalhos apresentarem sucesso no uso de 1-D-MT, esses efeitos devem ser levados em consideração pelos estudos clínicos (Opitz, Christiane A. *et al.*, 2011).

Conforme apresentado, a alta expressão de IDO1 em diversos tipos de tumores faz com que a via KYN esteja ativada, o que gera aumento dos metabólitos de Trp no microambiente e no plasma, impedindo a ativação e resposta do sistema imunológico e consecutiva eliminação do tumor. Todos esses compostos exercem alguma atividade biológica, seja sobre a célula tumoral ou estromal. Apesar da relevância dos metabólitos

da via KYN na progressão tumoral, a comunidade científica tem se restringido ao estudo de IDO e da formação de KYN (Suzuki *et al.*, 2010; De Jong *et al.*, 2011). Apenas mais recentemente alguns mecanismos envolvendo outros metabólitos do Trp na imunossupressão e no desenvolvimento e progressão dos tumores foi estudado.

A depleção local de Trp por si só já é capaz de gerar anergia e apoptose em linfócitos T (Platten, Wick e Van Den Eynde, 2012) e associado ao acúmulo de metabólitos, como KYN, gera efeitos de tolerância e imunoescape. O principal efeito de KYN se dá pela ligação ao receptor aril hidrocarboneto, o AhR. Apesar da descrição de que metabólitos do Trp poderiam induzir a translocação do receptor (Heath-Pagliuso *et al.*, 1998), foi recentemente que KYN foi descoberta como ligante endógeno do AhR (Opitz, C. A. *et al.*, 2011).

A ativação do AhR está envolvida com diversos processos fisiológicos como proliferação, diferenciação, motilidade e migração celular e inflamação. Não serão abordados os mecanismos, mas, em células tumorais, a ativação autócrina e parácrina do AhR está relacionada a um aumento de clonogenicidade e invasão (Gramatzki *et al.*, 2009).

Os metabólitos subseqüentes à KYN também possuem forte participação na patofisiologia do câncer. HK pode suprimir a proliferação de linfócitos T-CD4⁺ e induzir o desenvolvimento do fenótipo regulatório (Zaher *et al.*, 2011). O AA e o HAA estão envolvidos com a etiologia do câncer de bexiga (Teulings *et al.*, 1973) e ambos metabólitos podem auto-oxidar e gerar radicais intermediários mutagênicos que, como a KYN, podem interagir com o AhR (Chung e Gadupudi, 2011). Além disso, o aumento de HAA induz apoptose em linfócitos T CD8⁺, e a proliferação de todos os tipos de linfócitos é bloqueada (Weber *et al.*, 2006).

KA é capaz de induzir a adesão de monócitos a vasos e promover o desprendimento de L-selectina da membrana celular de neutrófilos, indicando seu potencial na ativação e recrutamento de leucócitos (Barth *et al.*, 2009). Por outro lado, KA é capaz de diminuir a produção de fator de necrose tumoral (TNF- α) por células mononucleares (Tiszlavicz *et al.*, 2011) e também é um potente ligante do AhR (Dinatale *et al.*, 2010). Recentemente foram descritas suas atividades antimigrativa e antiproliferativa em células CAKI-2, de tumor renal, e sua concentração em tecido de tumores renais humanos aparece decrescida por volta de quatro vezes os valores fisiológicos (Walczak, K., 2012.).

Mesmo os compostos finais da via KYN possuem atividade pró-tumoral. PA é capaz de diminuir a proliferação de linfócitos e de células NK, alterando a produção de quimiocinas e o recrutamento de leucócitos (Frumento *et al.*, 2002; Bosco *et al.*, 2003). Acredita-se também que a atividade de IDO aumente a síntese de QA, NA e NAM e mantenha os níveis de NAD⁺ altos, fator crucial para a proliferação celular incessante, o que ocorre com as células tumorais proliferativas (Chiarugi *et al.*, 2012).

A via SER também tem sido apontada como forte atuante em processos tumorais e na resposta imunológica. O aumento da via SER está relacionado à progressão maligna em câncer de mama humano (Juhasz *et al.*, 2012) e pacientes com síndrome carcinóide apresentam altas concentrações de SER e seu precursor 5-hidróxitriptofano (Shah *et al.*, 2005).

Diferente do que para outros metabólitos, a MLT é uma molécula com reconhecida atividade antitumoral. É sugerido que a MLT controla o crescimento tumoral por sua ação anti-angiogênica natural (Lissoni *et al.*, 2001) ou então através de seus efeitos imunomodulatórios, anti-proliferativos e antioxidantes (Bartsch, Bartsch e

Karasek, 2002). MLT pode também induzir apoptose em células tumorais (Sainz *et al.*, 2003). Apesar do mecanismo pelo qual a MLT exerce esses efeitos não ser totalmente esclarecido e os resultados originados da utilização farmacológica de MLT no tratamento de tumores não ser consistente, foi observada uma eficácia da MLT na estabilização de alguns tipos de carcinomas (Ravindra, Lakshmi e Ahuja, 2006).

Trabalhos do grupo demonstraram que AFMK e AMK mantêm as atividades biológicas reconhecidas para a MLT e SER sobre células do sistema imune, particularmente na inibição da produção de citocinas e da proliferação celular, muitas vezes em intensidades superiores à própria MLT sugerindo que a metabolização da MLT à AFMK em sítios inflamatórios teria um forte papel imunomodulatório (Silva *et al.*, 2000; Silva, S., Rodrigues, M., Carvalho, S., *et al.*, 2004; Silva, S., Rodrigues, M., Ximenes, V., *et al.*, 2004).

Apesar das funções descritas para o DMT no sistema nervoso (Riba *et al.*, 2001; Fontanilla *et al.*, 2009) não existem estudos sobre essa via metabólica em modelos patológicos. A única descrição dessa rota metabólica no câncer foi realizada pelo nosso grupo de pesquisa que identificou a habilidade de linhagens tumorais de melanoma humano em sintetizar DMT, sem caracterização funcional dessa molécula (Gomes *et al.*, 2014). E, sabendo que esse metabólito tem sido proposto como ligante do receptor S1R, e que esse receptor está sendo relacionado tanto com sobrevivência celular quanto com invasividade tumoral (Balasuriya *et al.*, 2012), talvez essa via metabólica seja de suma importância do desenvolvimento de algumas neoplasias.

1.3. Melanomas e linhagens celulares

O melanoma é uma neoplasia maligna dos melanócitos que são encontrados na camada basal da epiderme e produzem melanina. Na pele, o crescimento ou alteração da forma de lesão precursora é progressivo e se faz no sentido radial ou vertical. Na fase de crescimento radial, a neoplasia invade horizontalmente a epiderme, podendo atingir ou não a derme papilar superior. No sentido vertical, o seu crescimento é acelerado através da espessura da pele, podendo haver rompimento da membrana basal, e formar nódulos visíveis e palpáveis (Loeffek *et al.*, 2006). Durante sua progressão, melanócitos transformados atravessam a barreira dermoepidérmica e depois migram para a derme, principal local da propagação do melanoma (Labrousse *et al.*, 2004). Para isso, necessita-se primeiramente da aderência dessas células nos constituintes da matriz da membrana basal e do tecido dérmico, seguida de uma posterior degradação desta por enzimas proteolíticas secretadas pelas células transformadas, para que elas finalmente migrem em direção à corrente sanguínea (Ntayi *et al.*, 2004).

Os melanomas são tumores sólidos historicamente conhecidos como tumores altamente imunogênicos e são compostos por células neoplásicas, não-neoplásicas e imunológicas em várias proporções, mesmo numa única lesão (Ruiter *et al.*, 2002). É bem característica essa vasta heterogeneidade celular e morfológica, porém a conversa bioquímica entre essas células (tumoral-tecidual-imune) é bem conservada. Se tornou evidente que as respostas inflamatórias iniciais e persistentes tem um papel essencial em estabelecer um ambiente promotor da progressão tumoral. Em alguns casos o infiltrado de células imunológicas é tão maciço que chega a compreender mais de 70% das células do microambiente (Van Kempen *et al.*, 2003). Aliás, as características imunotípicas das células imunes infiltradas no tumor estão associadas com a evolução clínica dos pacientes com melanoma (Erdag *et al.*, 2012).

As células neoplásicas precisam da comunicação bilateral seja endócrina ou parácrina com as células estromais (fibroblastos, melanócitos, queratinócitos, células endoteliais e células imunológicas) para adquirir as diversas características ou assinaturas tumorais (Brandner e Haass, 2013) que fazem do melanoma, um dos tumores de pele mais letais.

Os melanomas correspondem a apenas 4% dos cânceres cutâneos porém são responsáveis por 60% a 75% das mortes por tumores de pele com aproximadamente 70000 casos, 8000 mortes em 2009 e um custo de US\$ 3 bilhões anuais somente nos Estados Unidos (Divito e Ferris, 2010).

O comportamento metastático está correlacionado aos fatores de prognóstico, como a espessura do tumor, taxa de mitose, presença de ulceração, infiltração de leucócitos, idade, sexo e sítio anatômico (Balch *et al.*, 2009; Eggermont, Spatz e Robert, 2014).

Na base de dados *Isi Web* existem 176.000 trabalhos relacionados à palavra melanoma. Aproximadamente 10% desses estudos são relacionados à mutações e proteínas oncogênicas em melanomas, sendo escassos os estudos em metabolismo (apenas 1%). Para o estudo bioquímico dos melanomas, além de células obtidas por excisão cirúrgica, linhagens celulares são comumente utilizadas. Essas linhagens apresentam diversas mutações (Tormo *et al.*, 2009)(Tabela 1), sendo as mais comuns em B-RAF, N-Ras e PTEN (aproximadamente 60%, 15 – 20% e 30 – 60%, respectivamente, dos casos). No painel de células selecionado para o presente estudo não se observa diferenças em p53, Bcl-2, Bcl-xL e caspase 8, em que o primeiro é selvagem e os outros são mutados em todas as células.

Tabela 1: Painel de mutações das linhagens de melanomas metastáticos utilizadas neste estudo.Retirado de (Tormo *et al.*, 2009).

Linhagem	B-RAF	N-Ras	PTEN
SK-MEL-19	Mutada	selvagem	-
SK-MEL-29	Mutada	selvagem	-
SK-MEL-147	selvagem	Q61R	+
UACC-62	Mutada	selvagem	ND
WM-1366	selvagem	Q61R	ND
1.4. Metabolismo do Trp na fisiologia da pele e na fisiopatologia do melanoma.

A hiperpigmentação, melanogênese, é a primeira resposta de proteção da pele aos danos mediados por exposição à luz UV, porém é um processo bioquímico energeticamente dispendioso (síntese de melanina). Além disso, a atividade fotoprotetora da melanina gera espécies reativas que podem ser danosas para a sobrevivência celular (Urabe *et al.*, 1994; Elmets e Athar, 2013). Desse modo, se faz necessária uma resposta localizada para restaurar o balanço na pele e prevenir efeitos secundários indesejados do aumento de síntese de melanina (Yamaguchi e Hearing, 2009).

Os mediadores fisiológicos para restabelecer **OS** níveis basais de hiperpigmentação são de difícil dedução devido a sua expressão e atividade transiente. Mesmo assim, uma análise do transcriptoma de melanócitos demonstrou que interferon- γ (IFN- γ) está negativamente associado ao processo de pigmentação celular e, o tratamento com IFN-y foi capaz de suprimir a ativação de genes relacionados à melanogênese, mesmo na presença de ativadores da pigmentação. Em modelo animal de exposição à luz UV, IFN-γ foi detectado na pele de camundongos após 6 h de exposição (Zaidi, M. R. et al., 2011). Em virtude de ser produzido por células imunes no local da lesão, o efeito de IFN-y parece ser ideal para a homeostase no tecido (Natarajan, V. T. et al., 2014).

Em resposta aos agentes radicalares gerados pela exposição à luz UV, os queratinócitos, por sua vez, induzem uma resposta de detoxificação pela indução da expressão de heme oxigenase-1 (Natarajan *et al.*, 2010). Muito interessante é a observação de que a atividade de heme oxigenase-1 mantém um perfil regulatório e

tolerogênico em linfócitos (Brusko *et al.*, 2005), efeito esse que também pode ser gerado por IFN-γ, já que o mesmo é capaz de induzir a expressão de IDO (Ozaki, Edelstein e Duch, 1988) que também possui atividade no desenvolvimento de tolerância imunológica.

Nosso grupo de pesquisa descreveu a habilidade de diferentes células da pele em responder ao tratamento de IFN- γ quanto a síntese e atividade de IDO, induzindo a via KYN (Moreno *et al.*, 2013). Alguns outros compostos da mesma rota metabólica são capazes de alterar a síntese de melanina na pele (Soddu *et al.*, 2004), demonstrando que o controle exercido por IFN- γ na melanogênese talvez se dê por modulação do metabolismo de triptofano.

Estudos realizados com lesão de pele demonstram a participação de IDO e principalmente do metabólito KYN como agentes anticicatrizantes e antifibróticos na recuperação de lesões, já que KYN e seu metabólito KA são capazes de induzir a expressão de metaloproteinases de matriz 1 e 3 e suprimir a síntese de colágeno tipo-1 e fibronectina em fibroblastos (Poormasjedi-Meibod *et al.*, 2014). Além de catálise mediada por IDO no processo de recuperação da pele, a luz é capaz de diretamente induzir a expressão e atividade de TDO em bactérias (Brady e Feigelson, 1973), efeito ainda não estudado em células de mamíferos.

Outra relação muito interessante entre o metabolismo de triptofano e a lesão mediada por UV, envolve a formação de fotoprodutos derivados de triptofano (Abel e Haarmann-Stemmann, 2010) que podem interagir, além de KYN, com o receptor aril hidrocarboneto (AhR). Em outras palavras, o aminoácido Trp no citoplasma de células da pele pode atuar como um cromóforo e absorver energia UVB e os fotoprodutos resultantes ativam a sinalização mediada por AhR, como pigmentação e inflamação na

pele. O AhR é expresso na grande maioria das células da pele e pode ser ativado tanto por xenobióticos e KYN, como por luz UV (Abel e Haarmann-Stemmann, 2010; Opitz, C. A. *et al.*, 2011).

Como apresentado anteriormente, a via KYN gera, além desse metabólito, uma gama de produtos, sendo QA, NA e NAM os metabólitos finais dessa rota. QA é agonista do receptor NMDA (Stone e Perkins, 1981), necessário para a manutenção da morfologia dos melanócitos (Hoogduijn *et al.*, 2006). QA, NA e NAM podem gerar NAD⁺. Como a síntese e renovação de NADPH é essencial para a reciclagem de glutationa (GSH), já que é cofator da glutationa redutase, e o sistema GSH/GSSG representa um dos principais mecanismos de defesa contra radicais produzidos tanto na pigmentação como no dano mediado por UV (Ebanks, Wickett e Boissy, 2009; Frasier *et al.*, 2013), o metabolismo de triptofano pode ainda colaborar com o fornecimento dos substratos da síntese de NADPH.

Além das relações da via metabólica das quinureninas com a resposta protetora em lesões supracitadas, a via SER de degradação do triptofano é altamente relacionada com o metabolismo normal da pele, e principalmente nos fenômenos de melanogênese e lesão (Slominski, Wortsman e Tobin, 2005).

SER e MLT são sintetizadas na pele e possuem diferentes funções descritas nesse órgão. A luz UV é capaz de ativar a enzima 5-hidróxi-triptofano descarboxilase, indicando que a síntese de SER pode ser mediada por luz UV na pele (Fraikin *et al.*, 1989). SER é descrita como vasodilatador, agente pro-inflamatório e pruritogênico, e MLT como hormônio e imunomodulador, realçando a importância dessa outra via metabólica para a patofisiologia dos melanócitos (Brusko *et al.*, 2005).

A MLT endógena é descrita como protetor da integridade da pele e regulador intácrino de melanogênese (Slominski *et al.*, 2014). A melatonina produzida na glândula pineal e envolvida com o ciclo circadiano têm, entre outros alvos, as células da pele que expressam seus receptores-ligante, MT1 e MT2 (Slominski *et al.*, 2003). Além disso, as próprias células da pele também sintetizam esse metabólito (Kobayashi *et al.*, 2005).

А melatonina tem demonstrado forte atividade anti-genotóxica em envelhecimento da pele e carcinogênese induzida por UV (Slominski et al., 2014). Há também uma relação direta entre o dano celular mediado por UV com a indução da expressão de receptores MT1 e MT2 em queratinócitos e melanócitos (Slominski et al., 2005). Além das atividades de melatonina, seu metabólito N¹-acetil-N²-formil-5metoxiquinuramina (AFMK) suprime a produção de espécies reativas de oxigênio induzida por UV em mitocôndria de maneira mais eficiente que a própria melatonina (Manda, Ueno e Anzai, 2007). Por fim, além de sua variável atividade em células da pele, MLT também suprime a produção de espécies reativas em linfócitos (Fischer et al., 2002).

Além da participação na fisiologia da pele, a marcação de IDO1 em linfonodos sentinela de pacientes com melanoma vem sendo considerada como marcador de ruim prognóstico (Speeckaert *et al.*, 2012). Não só a marcação de IDO em linfonodos, mas a diminuição sérica de Trp e o aumento de KYN (aumento da relação KYN/Trp) tem sido descrito como marcador prognóstico para pacientes com melanoma (Weinlich, Georg *et al.*, 2007). Assim, duas das vias metabólicas do triptofano participam ativamente da patofisiologia dos melanomas. Entretanto, o impacto destas rotas metabólicas sobre a progressão tumoral não é conhecida. Apesar das relevantes atividades na pele, no desenvolvimento e progressão tumoral e na resposta imunológica, uma análise completa

do metaboloma de Trp em câncer ainda não foi realizada, já que os estudos se restringiram, em sua grande maioria, a estudar a formação de KYN (Suzuki *et al.*, 2010; De Jong *et al.*, 2011).

2.0. OBJETIVOS

A fim de elucidar a participação do amplo espectro metabólico do triptofano em melanomas, o objetivo desse trabalho foi avaliar as diferentes rotas catabólicas do Trp em um painel de células que podem compor o microambiente tumoral e em amostras clínicas de nevos normais, displásicos e melanomas diagnosticados.

Sabendo da essencial participação de IFN-γ nos processos de eliminação e escape tumoral, esse último via ativação da via catabolismo de Trp, também foram avaliadas as atividades dessa citocina sobre o metabolismo de Trp nas diferentes células. E, devido ao forte impacto desse metabolismo no processo tumoral e do crescente uso de imunoterápicos inibidores de IDO na terapêutica, avaliamos o impacto de 1-DL-MT e dos isômeros separadamente 1-D-MT e 1-L-MT sobre o metabolismo de Trp nas linhagens tumorais de melanoma humano e em células da pele.

Especificamente, estudamos o metaboloma e/ou o secretoma de Trp em:

- Cinco linhagens tumorais de melanoma humano: UACC-62, WM-1366, SK-MEL-19, SK-MEL-29 e SK-MEL-147;
- Células normais da pele que compõe o estroma tumoral: fibroblastos e melanócitos dérmicos (ATCC PCS-200-012);
- Células imunológicas que podem ser encontradas infiltradas no microambiente de melanomas: linfócitos, macrófagos M1 e M2a (derivados de monócitos – MDM1 e MDM2), células dendríticas – maturas e imaturas (mDC e iDC, respectivamente) e neutrófilos. A fim de comparar o metabolismo das células

19

derivadas de monócitos com sua célula de origem, também realizamos o estudo do metabolismo em monócitos.

• Amostras clínicas de nevo normal, displásico e melanoma diagnosticado.

3.0. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Condições de cultura celular

3.1.1. Linhagens humanas de melanoma e de células primárias da pele (fibroblastos e melanócitos).

As células das linhagens de melanoma humano UACC-62, WM-1366, SK-MEL-29, SK-MEL-19 e SK-MEL-147 e os fibroblastos dérmicos humanos foram doados pela Profa. Dra. Maria Soengas – *Centro Nacional de Investigaciones Oncologicas (CNIO),* Madri, Espanha. Os melanócitos primários foram adquiridos da ATCC (*American Type Culture Colection*, PCS-200-012).

Todas as linhagens de melanoma foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (PAA Laboratories*, Alemanha) e os fibroblastos foram cultivados em meio *Dulbecco's Modified Eagle Media* (DMEM) (*PAA Laboratories*, Alemanha). Todos os meios supracitados foram suplementados de modo a terem 10% de soro fetal bovino (*PAA Laboratories*, Alemanha), 100 IU/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Os melanócitos foram cultivados em meio 254CF (M-254CF-500, *Life Technoligies*, Carlsbad, EUA) suplementado com *Human Melanocyte Growth Supplement* (HMGS) da mesma empresa.

Em todos os experimentos as células foram mantidas a 37° C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e a partir do terceiro estágio de cultivo em garrafas de 75 cm² (*Greiner Bio One*) e de acordo com o tempo de dobramento de cada célula (curvas de crescimento foram realizadas para cada tipo celular), as células foram plaqueadas de modo a que se obtivesse 60% de confluência no poço (placa de 6 poços; *Greiner Bio One* – área de crescimento de 9,6 cm²/poço) após 24 h do plaqueamento, quando o meio foi trocado e os estímulos, adicionados. Deste modo foram plaquados 3,5 x 10^5 células de SK-MEL-19, 2,5 x 10^5 células de UACC-62, 3,0 x 10^5 células de SK-MEL-29, e 3,0 x 10^5 células de WM-1366 e 2,5 x 10^5 células de SK-MEL-147, 2,0 x 10^5 células de fibroblastos e 4,0 x 10^5 células de melanócitos por poço.

Após 24 h do plaqueamento, o meio de cultura das células foi trocado por novo meio pré-aquecido a 37°C contendo os estímulos já adicionados: IFN- γ (Imunik – 2 x 10⁶ IU – 0,1 mg, *Boehringer Ingelheim*, Alemanha) na concentração final de 50 ng/mL) e 1-DL-MT (*Sigma*, St Louis, EUA) na concentração final de 1 mM.

Neste estudo foram realizadas soluções estoque de 0,5 M de 1-DL-MT, 1-D-MT e 1-L-MT (Sigma, St Louis, EUA) em NaOH 1 M previamente aos experimentos. Foram adicionados 40 μ L das soluções estoque em 20 mL de meio de cultura previamente preparado para obtenção da concentração final de 1 mM de 1-MT. O meio foi levemente agitado e filtrado em filtros 0,22 μ m *(VWR Sterile Filter – Cellulose)* e acondicionado em banho à 37°C por 20 min até ser utilizado. O pH dos meios de cultura contendo 1-MT não apresentaram alteração. O IFN- γ foi adicionado ao meio de cultura até concentração final de 50 ng/mL, o meio foi levemente agitado e pré-condicionado em banho a 37°C por 30 min previamente aos experimentos.

Após 24 h do plaqueamento das células em placa de 6 poços, os respectivos meios de cultura foram retirados e novo meio RPMI contendo 10% de SFB e com estímulos foi adicionado (1,2 mL por poço).

3.1.2. Células imunológicas de sangue periférico.

A fim de estudar o metabolismo de Trp de monócitos, linfócitos e neutrófilos, aproximadamente 60 mL de sangue periférico de jovens sadios foi coletado em tubos Vacutainer (367874, BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) contendo heparina. Após a coleta, o sangue foi separado em alíquotas de 20 mL em tubos já contendo 10 mL de tampão fosfato estéril (pH 7,4) pré-aquecido à 37 °C. A separação das células foi realizada por gradiente de densidade Ficoll-Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). A solução de sangue (30 mL) foi adicionada lentamente a tubos de fundo cônico contendo 15 mL de Ficoll-Histopaque previamente aquecidos a 37°C. Os tubos foram centrifugados por 30 min, a 18 °C a 900 x g (aceleração 6, desaceleração 2). Após separação, as células mononucleares (monócitos e linfócitos) foram lavadas em tubo cônico com meio de cultura RPMI sem soro fetal bovino e submetidas a centrifugação a 400 x g por 10 min. Após a lavagem com meio de cultura, 20 mL de tampão hemolítico gelado (0,83% NH₄Cl, 0,04% de EDTA e 0,1% NaHCO₃) foram adicionados às células, que foram centrifugadas novamente. O pellet celular foi lavado com tampão Beads gelado (tampão fosfato contendo 8,0 nM EDTA e 5% de albumina bovina sérica) e após centrifugação foi ressuspenso no mesmo tampão (80 µL). Para a seleção positiva de monócitos, 20 µL de MACS CD14 MicroBeads human (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha, 130-050-201) foram adicionadas e a suspensão foi homogeneizada e acondicionada em banho de gelo por 20 min, conforme orientação do fabricante. Após o período de incubação, 5 mL de tampão Beads foi adicionado e toda a suspensão foi centrifugada por 10 min a 400 x g, 4°C. O sobrenadante foi descartado e todas as células foram ressuspensas com 1 mL de tampão *Beads*. A separação magnética foi realizada em coluna LS (130-042-401, Miltenyi Biotec, Colônia, Alemanha) conforme orientação do fabricante. As células CD14 positivas foram centrifugadas, ressuspensas em 1 mL de tampão *Beads* e aplicadas em uma outra coluna LS, a fim de aumentar a pureza da separação dos monócitos. Após a segunda etapa de purificação, as células CD14 positivas foram centrifugadas e ressuspensas com 2 mL de meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) contendo antibióticos penicilina (100 IU/mL) e estreptomicina (50 µg/mL) e soro fetal de bezerro (10%) inativado por calor (FCS).

Para o estudo de linfócitos, após a separação dos monócitos, o lavado de células CD14-negativas foi centrifugado, ressuspenso com 10 mL de meio RPMI contendo antibóticos e 10% FCS e plaqueado por 1 h em placa 75 cm² (TPP, Trasadingen, Suíça). Após esse período, as células não aderidas foram retiradas da placa e utilizadas para os experimentos de metabolismo. O efeito da adição de IFN- γ sobre o metabolismo de triptofano foi estudado em todas as células, porém o efeito de fitohemaglutinina mitogênica (PHAm) sobre o metabolismo, foi apenas estudado em linfócitos e neutrófilos.

Para o estudo de neutrófilos, após a centrifugação com Ficoll-Histopaque, a fração de maior densidade, que contém dentre outras células, as hemácias, foi separado e adicionado de 20 mL de uma solução contendo dextran 4% em tampão fosfato. O tubo de fundo cônico foi acondicionado no gelo por 30 min, inclinados a 45° para permitir completa sedimentação dos eritrócitos. O sobrenadante resultante, rico em granulócitos, foi coletado e a ele foram adicionados 35 mL de tampão fosfato. O tubo foi centrifugado a 1000 x g a 25 °C por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspenso com 10 mL de água destilada a fim de eliminar os eritrócitos contaminantes. Apos 1 min de agitação leve, 5 mL de uma solução de NaCl 2,7% foi adicionada e o volume foi completo para 50 mL com tampão fosfato. O frasco foi centrifugado novamente a 1000 x g a 25 °C por 5 min e o sedimento celular foi

ressuspenso em meio de cultura RPMI contendo 10% de SFB. Para todos os experimentos, o número total de células foi obtido por contagem em câmara de Neubauer e 1,0 x 10^6 células foram plaqueadas em placa de 12 poços (3,8 cm² *cell culture cluster* Costar 3153, Corning Incorporated, Nova Iorque, EUA). As células foram cultivadas em 1 mL de meio de cultura RPMI contendo 10% de SFB e após 48 h de cultivo em estufa a 37 °C contendo 5% de CO₂, o meio de cultura foi utilizado para análise do secretoma e as células foram utilizadas para estudo de metaboloma.

3.2. Diferenciação de monócitos de sangue periférico em macrófagos (MDM-1 e MDM-2a) e em células dendríticas (imaturas e maduras, iDC e mDC).

A fim de estudar a participação metabólica das células imunológicas nos mecanismos de imunoescape via IDO, células imunológicas foram cultivadas, diferenciadas e o metabolismo de Trp estudado. Para garantir o fenótipo das células diferenciadas, ensaios em citometria de fluxo e ELISA foram realizados.

Devido a variabilidade de protocolos na literatura para a geração de células dendríticas e macrófagos derivados de monócitos (Smith, Feldmann e Londei, 1998; Verreck *et al.*, 2004; Way *et al.*, 2009; Rey-Giraud, Hafner e Ries, 2012), entramos em contato com o grupo do Prof. Dr. José Alexandre Barbuto (Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo), que é referência na geração tanto de células dendríticas como de macrófagos derivados de monócitos. Os protocolos utilizados no presente estudo foram estabelecidos pelo grupo de pesquisa do Prof. Barbuto. Os protocolos para geração de DCs já foram publicados (Oliveira *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2012; Pinho *et al.*, 2014), mas o manuscrito contendo o protocolo para geração de macrófagos ainda está em fase de elaboração.

Macrófagos e células dendríticas foram obtidos a partir da diferenciação de monócitos de sangue periférico de doadores sadios. Os monócitos foram cultivados em placa de 6 poços (2,0 x 10^6 células por poço) com 2 mL de meio RPMI contendo antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e soro fetal bovino (FBS) ou de bezerro (10%) inativados por aquecimento (FCS), de acordo com o tipo celular: dendríticas e macrófagos, respectivamente.

Para a diferenciação para macrófagos MDM-1, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos – GM-CSF (50 ng/mL) foi adicionado ao meio de cultura após o plaqueamento de monócitos. No quinto dia de cultivo, IFN-γ (20 ng/mL) foi adicionado ao meio de cultura e no sexto, lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL) (Figura 4). As células foram cultivadas mais 24 h, quando o meio foi trocado e as células cultivadas por mais 48 h para análise do metabolismo. Já para a diferenciação de macrófagos M2a, fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) (50 ng/mL) foi adicionado após o plaqueamento de monócitos. No quinto dia de cultivo, interleucina 4 – IL-4 (20 ng/mL) foi adicionada ao meio de cultura e, no sexto, LPS (100 ng/mL).

As células dendríticas foram diferenciadas a partir da adição de GM-CSF (50 ng/mL) e IL-4 (20 ng/mL) às culturas de monócitos. Para a geração de dendríticas maduras (mDC), no quinto dia de cultivo, 50 ng/mL de fator de necrose tumoral – alfa (TNF- α) foram adicionados e as células foram cultivadas por mais 48 h.

No sétimo dia de cultivo, todas as células (iDC, mDC, MDM1 e MDM2) foram retiradas da placa e utilizadas para fenotipagem por citometria de fluxo e validação da metodologia de diferenciação. Todas as células foram cultivadas por 7 dias em estufa a 37 °C sob atmosfera de CO_2 (5%). Para realização dos experimentos de metabolismo, após os 7 dias de diferenciação, o meio de cultura foi retirado e novo meio de cultura foi

adicionado (1 mL). As células foram cultivadas por 48 h na ausência ou na presença de IFN-γ (50 ng/mL). Todos os estímulos usados nesse estudo foram obtidos da marca Invitrogen, Estados Unidos.



Figura 4: Desenho experimental para diferenciação de monócitos de sangue periférico em macrófagos (MDM1 e MDM2) e células dendríticas (iDC e mDC).

Para avaliar a pureza da separação de monócitos obtidos pelo protocolo de seleção positiva por afinidade em *beads* CD14, 2,0 x 10^5 monócitos foram incubados com anticorpo anti CD14-FITC (E-Bioscience, San Diego, EUA) e anti CD3-APC-Cy7 (BD Pharmingen, New Jersey, EUA) em tampão fosfato contendo 3% de FBS por 20 min no gelo. Após o período, 2 mL do mesmo tampão foram adicionados às células, que foram centrifugadas e ressuspensas em 200 μ L do tampão e foram analisadas em citômetro FACSCanto II (BD Biosciences). O mesmo protocolo foi utilizado para estudar a contaminação de linfócitos na preparação de monócitos antes do protocolo de adesão celular.

Para estudo do fenótipo de macrófagos foram utilizados os anticorpos anti CD80-PE, CD86-PE, CD163-PerCp, CD14-FITC e anti CD68-APC intracelular. Para a avaliação da marcação de CD68 intracelular por citometria de fluxo se fez necessária uma permeabilização celular. O protocolo utilizado foi o indicado pelo fabricante do anticorpo (eBioscience – *Staining intracellular antigens for flow cytometry*). Os anticorpos para citometria de fluxo acima citados foram obtidos de BD Pharmingen (*New Jersey*, EUA) e de e-Bioscience (*San Diego*, EUA).

O estudo da produção de citocinas TNF- α e IL-10 por macrófagos MDM-1 e MDM-2a, foi realizado no meio de cultura das células após os sete dias de diferenciação. A produção de citocinas foi avaliada por ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*, de acordo com protocolo de fabricantes dos kits comerciais Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit e Human IL-10 Quantikine ELISA Kit, ambos do fabricante R&D (catálogo STA00C e S1000B, respectivamente; R&D, Estados Unidos).

A diferenciação para macrófagos foi avaliada pelo aumento substancial da marcação de CD68-APC intracelular (Figura 5), que chegou a 80% de marcação nas células estudadas.



Figura 5: Marcação de CD68-APC intracelular em MDM-1 após 7 dias de cultivo.

Para garantir a diferenciação para MDM-1 foram avaliadas as marcações de CD86-PE (Figura 6) e a síntese e secreção de TNF-α (Figura 7). Já para MDM-2 foram avaliadas as marcações de CD163-PerCP (Figura 6) e a síntese e secreção de IL-10

(Figura 7). O aumento das marcações de CD86 em MDM-1 e CD163 em MDM-2 já haviam sido reportadas como marcadores da diferenciação (Rey-Giraud, Hafner e Ries, 2012). Associadas a síntese e secreção de TNF-α por MDM-1 e de IL-10 por MDM-2, também descritas (Fairweather e Cihakova, 2009; Sindrilaru *et al.*, 2011), asseguramos sucesso na obtenção de MDM-1 e MDM-2a.



Figura 6: Marcação para CD86-PE e CD163-PerCP em macrófagos diferenciados de monócitos MDM-1 e MDM-2 e macrófagos de 7 dias de cultivo (M7) de dois doadores sadios (doador 1 e doador 2). Em A são apresentadas as marcações de CD163 onde podemos observar que o MFI para MDM-2 é bem mais intenso, e em B são apresentadas as marcações para CD86 em que são observadas MFI mais intensas para MDM-1.



Figura 7: Quantificação de TNF- α (**A**) e IL-10 (**B**) em meio de cultura de MDM-1, MDM-2 e M7. As diferenças estatísticas foram baseadas em Teste ANOVA com post Tukey (* p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001).

A fim de facilitar a visualização dos diferentes fenótipos celulares obtidos na diferenciação, apresentamos as duplas marcações CD86 vs CD163 em MDM-1 e MDM-2 (Figura 8).



Figura 8: Dupla marcação CD86-PE vs CD163-APC. Em A é apresentada a população de MDM em tamanho e granulosidade. Em B a dupla marcação em MDM-1 e em C a dupla marcação em MDM-2.

Para a geração de células dendríticas imaturas (iDC), inicialmente usamos um protocolo já descrito (Sousa *et al.*, 2009). Para análise da diferenciação, utilizamos como marcador anticorpos anti-CD1a. Monócitos provenientes de diferentes doadores

foram utilizados e citocinas provenientes de dois fabricantes para a diferenciação em iDC foram testadas. Porém, após várias tentativas de diferenciação, o maior rendimento de células marcadas para CD1a foi de 67% (Figura 9). Mesmo com citocinas, GM-CSF e IL-4, de diferentes fabricantes não foram observadas alterações na marcação para CD1a. Em todas as tentativas realizadas, as marcações variaram de 20% a 70%, e não chegaram a 90% como orientado no protocolo, o que demonstra que o CD1a é insatisfatório para a determinação do fenótipo de células dendríticas.



Figura 9: Marcação de CD1a após a diferenciação de monócitos para células dendríticas imaturas (iDC). Em A é apresentada a população de células dendríticas imaturas diferenciadas quanto ao tamanho e granulosidade. Em B é apresentada a fluorescência basal das células não marcadas. Em C e D são apresentadas as melhores marcações para CD1a em iDC após estímulo de monócitos com GM-CSF e IL-4 provenientes de diferentes fabricantes BD (C) e Peprotech (D).

Na literatura, o CD1a não é utilizado como marcador único da diferenciação para células dendríticas, mesmo porque é um marcador que pode ser negativo em algumas das populações desse tipo celular (Gogolak *et al.*, 2007). Com a dificuldade na definição da população de células dendríticas, contatamos o Prof. Dr. Alexandre Barbuto (ICB-USP) que nos orientou outro protocolo de diferenciação, onde o fenótipo das células dendríticas obtidas é melhor elucidado (Oliveira *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2012; Pinho *et al.*, 2014). Para a determinação do fenótipo de membrana da população de células dendríticas, monócitos foram marcados antes e após a diferenciação para células dendríticas imaturas com anticorpos anti CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR e CD14 (Figura 10).



Figura 10: Fenótipo de membrana de monócitos e iDC para CD40, CD83, CD86, CD14, CD80 e HLA-DR, respectivamente. São apresentadas as freqüências e as medianas das marcações.

O aumento de marcação para CD40 obtido já era esperado, bem como o aumento de CD86. A dendrítica imatura, assim como o monócito, não expressa CD83. Já o monócito não expressa CD80 que aumenta para iDC, além de uma diminuição na marcação em CD14, característica do processo de diferenciação. Os resultados de marcação acima apresentados corroboram os dados apresentados na literatura de células dendríticas imaturas diferenciadas de monócitos (Ramos *et al.*, 2012; Pinho *et al.*, 2014).

A maturação de células dendríticas é baseada na adição de uma outra citocina, TNF-α, durante o processo de diferenciação. As mDC adquirem outro fenótipo e devem aumentar marcação de membrana para CD40 e CD83 quando comparadas às iDC (Figura 11).



Figura 11: Fenótipo de membrana de monócitos, iDC e mDC para CD40, CD83, CD86, CD14, CD80 e HLA-DR, respectivamente. São apresentadas as freqüências e as medianas das marcações.

A análise fenotípica de membrana de dendríticas maduras demonstra um aumento esperado na marcação para CD40. CD83 que é outro marcador clássico ativação de DC (mDC) não apresentou aumento frente às outras células. Posteriormente, descobriu-se que o anticorpo usado não estava funcionando e o experimento foi realizado novamente (Figura 12) com outro anticorpo. Nesse experimento podemos observar uma baixa marcação para iDC que aumenta nas células mDC, corroborando a fenótipo de ativação (Pinho *et al.*, 2014). A análise morfológica de iDC e mDC (Figura 13) também corrobora o fenótipo diferenciado.



Figura 12: Marcação para CD83-APC em iDC (1) e mDC (2). Em A são apresentadas as populações de células, em B a fluorescência basal das células e em C a % de marcação.

Somando todos os resultados dos fenótipos celulares acima apresentados, podemos garantir o sucesso do protocolo de diferenciação de monócitos para células dendríticas o que nos permitiu avaliar o metabolismo do Trp dessas células.



Figura 13: Morfologia das células dendríticas imaturas (iDC) e maduras (mDC) derivadas de monócitos em diferentes aumentos 10X, 20X e 40X.

3.2.1. Desenho experimental.

Para o estudo do metabolismo basal das diferentes células imunológicas, 1,0 x 10^6 células foram plaqueadas em placa de 24 poços (área de 1,9 cm², 15,6 mm diâmetro, Corning) em 500 µL de meio RPMI contendo 10% de FBS. Para o estudo do efeito de IFN- γ no metabolismo de Trp das células imunológicas, foram adicionados 50 ng/mL de IFN- γ (Gibco – Invitrogen) ao meio de cultura.

Além das alterações metabólicas geradas por IFN- γ , no estudo do metabolismo de linfócitos (células CD3 positivas), um grupo de células foi tratado com 20 µg/mL de lectina de *Phaseolus vulgaris*, fitohemaglutinina mitogênica (PHA) – que também foi adicionada ao meio de cultura no momento do plaqueamento celular. Em todos os grupos do estudo, as células foram incubadas em estufa a 37 °C sob 5% de atmosfera de CO₂ por 48 h, quando os metabólitos foram extraídos do meio.

3.3. Extração de metabólitos.

3.3.1. da cultura das linhagens humanas de melanoma e de células primárias da pele (fibroblastos e melanócitos).

Todos os experimentos com as linhagens de melanoma foram realizados em 4 tempos após período de incubação com os estímulos: 3 h, 6 h, 12 h e 24 h e todos os experimentos foram realizados em triplicata. O método utilizado para estudo do secretoma e metaboloma de células da pele e das linhagens tumorais de melanoma humano foi publicado por (Zhu *et al.*, 2011), *Regensburg Universitat*, Alemanha.

Após o devido período de incubação o meio de cultura foi separado para quantificação dos analitos de interesse, e as células foram lavadas três vezes com Tampão Fosfato (Na₂HPO₄ 7,78 mM, KH₂HPO₄ 2,22 mM, NaCl 277,2 mM e KCl 5,43 mM). Após o processo de lavagem, foram adicionados 700 μL de uma solução gelada contendo metanol 80% em água MilliQ e 10 μ L da solução estoque dos padrões internos (PI) e as células foram lisadas por raspagem com uso de extrator (90020 *Cell Scraper*, 13 mm *blade wide, Scraper SPL Life Sciences,* Coréia do Sul). Após homogeneização com pipeta, todo o volume foi retirado dos poços e foram adicionados mais 500 μ L da solução de metanol 80% para lavar os poços. Após a extração, a suspensão contendo a amostra foi acondicionada em freezer por 1 h e toda a suspensão foi centrifugada a 10.621 x *g* por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi seco à vácuo e ressuspenso em 100 μ L de uma solução contendo ácido fórmico 0,1%.

Os meios de cultura foram utilizados para estudo do secretoma. O meio de cultura foi centrifugado e o sobrenadante utilizado para extração dos analitos. Em 100 μ L do meio de cultura foram adicionados 10 μ L da solução estoque contendo PI e 400 μ L de metanol gelado (-20°C) a fim de se obter uma concentração final de 80% MeOH conforme publicado por (Dettmer *et al.*, 2011). Os tubos foram vortexados por 10 s e acondicionados a -20°C por 1 h para assegurar completa precipitação de proteínas, quando foram centrifugados a 10.621 x *g* por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e seco em evaporador a vácuo (*CombiDancer*, Hettich AG, Bach, Suíça) e ressuspenso em 100 μ L de uma solução contendo ácido fórmico 0,1% em água e a quantificação dos metabólitos foi realizada por cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas.

3.3.2. da cultura de células imunológicas.

Para a extração dos metabólitos, o meio de cultura foi retirado da placa, centrifugado a 300 x g por 5 min para separar as células não aderentes do sobrenadante celular. O sobrenadante (500 μ L) foi adicionado a um microtubo de 2 mL contendo 1,5 mL de metanol gelado. Após a adição da amostra, 10 μ L de uma solução estoque de

padrão interno (MLT-D7 417,9 nM, TME 5 μ M e HIAA-D2 5 μ M) em metanol foram adicionados aos microtubos, que foram vortexados por 1 min, e armazenados por 1 h a – 20°C para total precipitação das proteínas do meio de cultura. Posteriormente, os microbutos foram submetidos a centrifugação a 14.000 x *g* por 10 min a 4 °C . O sobrenadante dos microtubos foi separado e filtrado em coluna em placa *Phree Phospolipid Removal* (Phenomenex, EUA) para remoção de proteínas e fosfolipídeos da amostra. Posteriormente, as amostras foram transferidas para um tubo de vidro e secas sob atmosfera de gás nitrogênio, sendo reconstituídas em 100 μ L de uma mistura de água:metanol (9:1) contendo 0.1% de ácido fórmico.

A fim de elucidar também o metabolismo de Trp intracelular, após a centrifugação inicial do meio de cultura, ao sedimento das células não aderentes foi adicionado 500 μ L de metanol gelado e 10 μ L da solução de PI. Para células aderentes, após três lavagens com tampão PBS, foram adicionados 500 μ L de metanol e 10 μ L da solução de padrão interno aos poços, e as células foram lisadas por raspagem com uso de rodo (Scraper SPL Life Sciences). O material obtido foi coletado e os poços foram lavados com mais 500 μ L de metanol gelado. Assim, todas as células foram vortexadas por 1 min, centrifugadas e tratadas da mesma forma que as amostras de sobrenadante da cultura celular.

3.3.3. Das amostras clínicas de melanoma.

As amostras clínicas foram armazenadas em freezer a - 80 °C diretamente após a coleta cirúrgica. Após o descongelamento, as amostras foram pesadas e transferidas para um tubo de vidro de fundo cônico, onde procedeu-se a maceração na presença de 1,5 mL de metanol e 10 µL da solução estoque de PI. As amostras foram maceradas por aproximadamente 2 min, quando foram transferidas para um microtubo de 2 mL. O tubo de fundo cônico foi lavado com 0,5 mL de metanol, que foi também adicionado ao microtubo. As amostras foram armazenadas em freezer a – 20°C por 1h e centrifugadas a 10.000 x g por 10 min a 4 °C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi filtrado em coluna em placa *Phree Phospolipid Removal* (Phenomenex, EUA). Após a filtração, as amostras foram transferidas para um tubo de ensaio de vidro, secas sob atmosfera de gás nitrogênio e reconstituídas em 100 μ L de uma mistura de água:metanol (9:1) contendo 0.1% de ácido fórmico.

3.4. Instrumentação analítica para estudo do metabolismo de triptofano.

3.4.1. Em linhagens humanas de melanoma e de células primárias da pele (fibroblastos e melanócitos).

A quantificação dos metabólitos foi realizada em método já validado e publicado por (Zhu *et al.*, 2011). Um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Agilent 1200 SL (*Agilent*, Alemanha) acoplado a um espectrômetro de massas 4000 QTrap (*Applied Biosystems*, Alemanha) equipado com *Eletrospray* como fonte de ionização operado no modo positivo foi usado. Para aquisição e análise dos dados foi utilizado o programa Analyst v1.5.1 (Applied Biosystems/MDS SCIEX).

Para realização da cromatografia foi utilizada uma coluna de fase reversa Atlantis T3 (2,1 x 150 mm, 3 μ m) (Waters, Alemanha) à 25 °C. Todos os analitos foram detectados no modo turbo íon spray positivo em modo MRM (monitoramento de múltipla reação) com voltagem de 5500 V, e temperatura da fonte iônica de 500 °C e com a fonte de gás à 50 psig e o gás de colisão foi selecionado em intensidade média no equipamento. As massas dos analitos, os tempos de retenção e as energias de colisão

(CE) são apresentados na Tabela 2.

Analito	Tempo de Retenção (min)	m/z em Q1	m/z em Q3	CE	LOD (nM)	Linearidade (nM)
NA	2.36	124	80	31	1.0	5,0 - 10.000
NAM	2.75	123	80	31	0.4	1,0 - 10.000
QA	3.03	168	149	15	50	100 - 20.000
НК	4.76	225,2	208	13	1.0	2,0 - 10.000
SER	5.9	177,2	160,1	15	0.6	1,0 - 4.000
KYN	6.26	209,1	192	13	0.4	1,0 - 7.500
HAA	7.25	154,2	80	36	3.0	5,0 - 10.000
TRP	7.57	205,1	118.1	26	10.0	50 - 200.000
TRY	7.79	161	144	15	0.2	0,5 - 1.000
ХА	8.12	206,2	160	27	0.3	1,0 - 5.000
KA	8.56	190,2	144	30	0.3	1,0 - 5.000
HIAA	9.01	192,2	146	21	2.0	5,0 - 10.000
AA	10.28	138,2	120	15	0.4	1,0 - 1.000
IAA-Gly	10.56	233	130	23	0.2	0,5 - 1.000
ILA	11.19	206,2	130	39	1.0	5,0 - 10.000
MLT	11.66	233,1	174	21	0.1	0,5 - 1.000
IAA	12.37	176,2	130	25	0.3	1,0 - 7.500
IPA	13.44	190,2	130,1	22	0.6	1,0 - 7.500

Tabela 2: Validação do método para quantificação do metabolismo de Trp contendo tempo de retenção, m/z, energia de colisão (CE), limite de detecção (LOD) e linearidade. (Retirado de Wentao Z et al 2011).

No método validado por Wentao Z, *et al*, 2011, foram utilizados padrões internos (PI) deuterados e soluções estoque que foram preparadas para que se pudesse preparar uma mistura (*mix*) de todos os padrões internos, apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros da otimização dos padrões internos utilizados para a quantificação dos metabólitos no método de Wentao *et al* 2011.

Analito	D	Conc. Estoque	Conc. Estoque Diluído (1mL)	Volume do Estoque Padrão Interno para o Mix	Conc. final do estoque MIX de Padrão Interno (10mL)	Tempo de Retenção (min)	m/z em Q1	m/z em Q3	CE
		mM	μΜ	μl	μΜ	(min)			(V)
QA	d3	14,17	1000	500	50	3.0	171	153	15
TRP	d5	10	1000	1000	100	7.54	210, 2	122	26
KA	d5	2,88	200	250	5	8.53	195, 2	149	30
KYN	d4	2,827	100	500	5	6.23	213, 1	196	13
HAA	d2	5,03	100	1000	10	7.22	156, 2	82	36
IAA	d2	10,16	200	500	10	12.35	178, 2	132	25
НК	d3	0.2	2000	480	50	4.74	228, 2	211	13
AA	d4	10,49	100	200	2	10.26	142, 1	124	15
MLT	d4	4,23	100	100	1	11.62	237, 1	178	21
HIAA	d5	5,1	1000	100	10	9	197, 2	151	21
SER	d4	1,636	100	200	2	6.9	181. 1	164	15
NA	d4	15,58	1000	100	10	2.34	128	84	31
NAM	d4	10	1000	100	10	2.72	127	84	31
IAA-Gly	d2	0,5	50	400	2	10.54	235	132	23
TRY	d4	8,47	100	200	2	7.77	165	148	14

A separação cromatográfica dos metabólitos foi realizada a partir de um gradiente linear de solventes: 0 - 10 min, aumento de 0 - 40% B, 10 - 12 min, aumento de 40% a 95% de B, 12 - 12.1 min diminuição de 95% a 0% de B, perdurando por mais 5 min. As fases móveis utilizadas foram: A: ácido fórmico 0,1% em água e B: acetonitrila contendo 0,1% de àcido fórmico. O fluxo durante toda a cromatografia foi de 0,4 mL/min. O efluente da coluna foi diretamente ao equipamento sem uso de *Split*.

Como não participei de nenhuma atividade da validação do método de Wentao Z, *et al*, 2011 e apenas realizei novas curvas analíticas para quantificação dos metabólitos, soluções estoque de padrão interno, manutenção diária do equipamento e análise de meus dados, não serão apresentados os dados de validação da metodologia que se apresentam no trabalho de Wentao Z, *et al*, 2011.

3.4.2. Em células imunológicas e amostras clínicas.

Para o estudo do metabolismo de triptofano em células imunológicas e amostras clínicas, realizamos uma colaboração com o Prof. Dr. Ernani Pinto e sua aluna de doutorado Ariane Rivellis Julio que desenvolveu e validou uma metodologia bioanalítica para quantificação de metabólitos do triptofano em nosso departamento. Devido a proximidade de nossos objetivos, trabalhamos e validamos a metodologia em parceria, porém os dados obtidos no processo de validação serão apresentados excepcionalmente na tese da respectiva aluna.

O instrumento utilizado é composto por Bombas LC 1250 Bin Pump VL, autoinjetora 1260 HiP ALS, (todos da Agilent Technologies, Califórnia, Estados Unidos) acoplado a um espectrômetro de massas 6460 - triplo quadrupolo LC-MS/MS (Agilent Technologies, Califórnia, Estado Unidos) equipado com uma fonte ESI, que foi operada no modo positivo. As análises foram realizadas a partir do software *MassHunter* (Agilent Technologies, Califórnia, Estado Unidos) e os dados coletados a partir do modo monitoramento de múltipla reação (MRM). Para a obtenção dos íons precursor e produto, energia de colisão e abundância de cada íon, uma infusão direta de uma solução mix contendo 10 µmol.L⁻¹ de cada um dos metabólitos de interesse foi aplicada no equipamento e avaliada pelo software Optmizer (Agilent Technologies, Califórnia, Estado Unidos) (Tabela 4). Outros parâmetros obtidos para a análise foram: capilar a 3.500 V, temperatura do gás: 250 °C, vazão do gás: 5 L.min⁻¹, nebulizador: 45 psi, temperatura do gás: 200 °C e voltagem da agulha: 500 V.

Tabela 4: Parâmetros da otimização dos analitos de interesse: íon precursor (m/z), íon produto
(m/z), fragmentor e energia de colisão (V).

Metabólitos	Íon Precursor (Q1)	Íon Produto (Q3)	Fragmentor	Energia de Colisão
NA	124	80	84	22
AA	138	120	70	14
TRY	161	144	74	18
KYM	165	136	79	14
QA	168	78	60	14
IAA	176	130	79	14
SER	177	160	89	10
DMT	189	58	49	14
КА	190	89	59	14
5-HIAA	192	146	84	46
TRP	205	146	74	10
ХА	206	160	50	10
KYN	209	94	79	14
MEL	233	174	54	10
АМК	237	136	36	15
AFMK	265	136	103	22
Padrões Internos	Íon Precursor (Q1)	Íon Produto (Q3)	Fragmentor	Energia de Colisão
5-HIAA-D2	194	148	80	22
ТМЕ	219	160	41	15
MEL-D7	240	178	45	10

* A cor de fundo das células representa qual PI foi utilizado para normalizar as concentrações de cada analito, de acordo com a marcação da parte inferior da tabela. Para análise dos metabólitos em branco, 5-HIAA-D2 foi como PI. Em fundo cinza claro, TME foi usado como PI e em cinza escuro, MEL-D7 foi usada como PI.

O método cromatográfico foi realizado em um gradiente de eluição com 10 mM de formiato de amônio e 0.5 % de ácido fórmico, pH 2, em água MilliQ (Millipore) (A)

e ACN (B). O volume de injeção foi de 10 μ L e a vazão utilizada durante toda a cromatografia foi de 0.2 mL.min⁻¹ na coluna Luna C18(2) (150 mm x 2 mm, 3 μ m, Phenomenex). O gradiente de eluição utilizado foi: (i) 0 - 15.00 min (100(A):0(B) - 5(A):95(B)), (v/v); (ii) 15.00 - 16.00 min (5(A):95(B)), (v/v); (iii) 16.00 - 17.00 min ((5(A):95(B) - 100(A):0(B)), (v/v); (iv) 17.00 - 22 min (100(A):0(B)), (v/v), para reequilibrar a coluna.

3.5. Comitê de ética em pesquisa.

Para a realização desse estudo, foram enviados dois projetos ao Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCF-USP. O primeiro projeto objetivou o estudo do metabolismo de Trp em linhagens tumorais de melanoma humano, células normais da pele e células mononucleares de sangue periférico de indivíduos sadios, sendo o seu número de aprovação P/CEP/FCF/562. O outro projeto foi enviado aos comitês de ética em pesquisa da FCF-USP e da Fundação Antônio Prudente, o Hospital do Câncer AC Camargo, em São Paulo. Nesse projeto, realizado em parceria com o Núcleo de Câncer de Pele do *AC Camargo Cancer Center* objetivamos o estudo do metabolismo de triptofano em amostras clínicas de nevos normais, nevos suspeitos e amostras clínicas de melanoma diagnosticado. Esse projeto foi aprovado em ambos os Comitês e pode ser avaliado pelo CAAE 21175413.1.3001.5432 no site da Plataforma Brasil.

3.6. Análise Estatística

As análises estatísticas dos resultados comparativos do metabolismo entre as células foi realizada por teste ANOVA (Análise de Variância) seguida pelo teste de Bonferroni. Para os comparação do metabolismo entre basal e os tratamentos, foi realizado Teste t seguido pelo teste de Bonferroni com valor de *q* selecionado para 0,1. Os resultados serão expressos em gráficos com erro padrão, de no mínimo, triplicata de três experimentos independentes. Salvo para o estudo das células imunológicas, em que os experimentos foram realizados em triplicata de dois experimentos independentes. As análises estatísticas estão apresentadas em Tabela na sessão 8.0. ANEXOS. Outras abordagens estatísticas também foram consideradas e estão apresentadas no texto.

4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de promover o entendimento dos resultados obtidos, a presente seção foi dividida em duas partes. No primeiro capítulo serão apresentados os resultados referentes ao estudo de metabolismo de Trp em linhagens tumorais de melanoma e células normais da pele e, no segundo, serão apresentados os resultados referentes ao estudo do metabolismo de Trp em células imunológicas e amostras clínicas. Ao final de cada sessão será apresentado um Esquema que irá descrever um resumo dos resultados descritos. CAPÍTULO 1. Estudo do metabolismo de Trp em linhagens tumorais de melanoma humano e em células normais da pele.

4.1. Metabolismo de Trp e o efeito da adição de IFN- γ em melanomas e células normais da pele.

Devido a particularidade genética das linhagens de melanomas e da forte participação do metabolismo do Trp na fisiologia da pele, estudamos o metabolismo basal em células da pele, que compõe o estroma tumoral (fibroblastos e melanócitos) e em cinco linhagens tumorais de melanoma metastático humano.

O Trp é o substrato inicial de todas as vias estudadas e, além disso, é um aminoácido essencial, sendo largamente utilizado para síntese protéica. O Trp é consumido de maneiras diferentes pelas células, porém pode-se observar que as células da pele são as que menos consumiram Trp do meio de cultura, o que pode estar relacionado aos maiores tempos de dobramento celular quando comparadas às células tumorais. Por sua vez, KYN é o metabólito que menos varia entre as células (Figura 14), sendo apenas sintetizado pelos fibroblastos.

Dos metabólitos diretos de KYN, o KA presente no meio de cultura foi consumido por todas as células, AA foi sintetizado apenas por SK-MEL-147 e pelo melanócito e HK foi sintetizado principalmente por UACC-62, SK-MEL-147 e pelo melanócito. Tal efeito parece ser relevante, já que HK suprime a proliferação e induz o fenótipo regulatório em linfócitos T-CD4⁺ (Zaher *et al.*, 2011) e mostra que mesmo sem a indução de IDO com IFN- γ células tumorais e normais da pele podem exercer um controle direto sobre linfócitos no microambiente. Não só por HK, mas HAA que também é sintetizado por duas linhagens tumorais e pelos fibroblastos também altera a proliferação de linfócitos CD8⁺ (Weber *et al.*, 2006). Por outro lado, HK e HAA podem

proteger as células de dano oxidativo mediado por radicais peroxila (Christen, Peterhans e Stocker, 1990), e representar uma defesa antioxidante local contra o dano mediado por luz UV ou processo inflamatório.



Figura 14: Via catabólica das quinureninas em linhagens tumorais de melanoma e em células da pele (melanócitos e fibroblastos dérmicos).

Os melanócitos foram as únicas células que consumiram totalmente XA e QA do meio de cultura nas condições basais, o que sugere que esses metabólitos tenham uma relevância biológica para melanócitos normais que ainda não foi descrita. É interessante observar que QA é um agonista endógeno do receptor NMDA (Stone e Perkins, 1981), que é necessário para a manutenção da morfologia dos melanócitos (Hoogduijn *et al.*, 2006).

Em câncer cervical primário foi observado um aumento das concentrações de QA e uma diminuição das concentrações de KA (Fotopoulou *et al.*, 2011). Em nosso estudo, apesar de observarmos um consumo de KA pelos melanomas, não observamos um aumento de QA em todas as células, o que demonstra que esse tipo de relação KA/QA não parece ser plausível para melanomas.

NA foi totalmente consumido pela maioria das células com exceção de SK-MEL-147, que em contrapartida foi a célula que mais consumiu NAM. Recentemente, o consumo de NAM do meio de cultura foi observado por hepatócitos normais mas não por hepatócitos transformados (Dettmer *et al.*, 2013). Essa diferença entre células transformadas e não-transformadas não foi observada no par melanócito-melanoma.

Com relação a via SER observamos que algumas linhagens são capazes de sintetizar SER, porém a síntese de seu metabólito HIAA foi mais proeminente (Figura 15). A síntese de SER na pele (Slominski *et al.*, 2002) e por células de melanoma (Mcewan e Parsons, 1987) já havia sido descrita. Infelizmente, devido a um erro analítico, a quantificação de SER em melanócitos não foi realizada, o que impediu que se confirmasse que a síntese de SER na pele seja via melanócitos.

A análise da via das triptaminas (Figura 16) permitiu observar que algumas linhagens tumorais são capazes de sintetizar triptamina e que outras linhagens bem como as células normais consomem triptamina do meio de cultura. Tais resultados, associados ao fato de que o grupo de pesquisa já demonstrou a síntese de outro metabólito da TRY, o DMT, por uma das linhagens desse estudo (Gomes *et al.*, 2014) apontam a importância dessa via catabólica para estudos futuros. De fato, a captação e consumo de TRY por melanócitos está relacionada a fotomodulação/fotoproteção do ciclo celular de melanócitos (Iyengar, 1998). Os resultados de captação de TRY por melanócitos e por apenas algumas das linhagens tumorais demonstra que talvez um dos mecanismos de fotoproteção em resposta à exposição ao UV seja perdido em alguns tipos de melanoma. E, ainda, sugere um potencial terapêutico, com relação a susceptibilidade à fototerapias nas células que não consomem esse metabólito para manutenção da homeostasia.



Figura 15: Via serotoninérgica em linhagens tumorais de melanoma e em células da pele (melanócitos e fibroblastos dérmicos).



Figura 16: Via das triptaminas em linhagens tumorais de melanoma e em células da pele (melanócitos e fibroblastos dérmicos).

O tratamento com IFN- γ induz um consumo significativo de Trp, principalmente na linhagem tumoral SK-MEL-147 (Figura 17) e quase depleção completa em melanócitos e fibroblastos primários. Entre as linhagens celulares, o aumento de KYN induzido por IFN- γ variou de 4- a 50- vezes as concentrações encontradas no basal. Como as células tumorais são alvos obrigatórios da citocina (Dunn, Koebel e Schreiber, 2006), as diferenças observadas na abundancia de KYN podem ser resultado de expressão dos receptores de IFN- γ (IFNGR 1 e 2) alterada ou devido a expressão anormal de JAK1/2 ou STAT1 entre as linhagens de melanoma estudado.

Em células normais, o aumento nas concentrações de KYN gerado por IFN- γ variou de 25- nos fibroblastos a 76- vezes em melanócitos as concentrações encontradas no basal. A habilidade do IFN- γ em afetar o metabolismo das células normais pode contribuir para processos fisiológicos na derme, como o recém identificado papel de IFN- γ na maturação do melanossoma e, assim, na homeostasia da pigmentação (Natarajan, V. T. *et al.*, 2014). Além disso, IFN- γ tem sido insinuado como agente

indutor da gênese de melanomas induzido por luz, possivelmente pela geração de tolerância imunológica na célula transformada por UV (Zaidi, M. Raza *et al.*, 2011). Um estudo interessante é que células da pele tratadas com IFN-γ são capazes de impedir a proliferação de mononucleares em sangue periférico em co-cultura, via catabolismo de Trp (Schrocksnadel *et al.*, 2006).

Dadas as mais altas concentrações de KYN encontradas no sobrenadante de cultura de células normais da pele e a recente observação de que IDO em melanomas está expressa no ambiente peritumoral (Chevolet *et al.*, 2014), parece intrigante especular que as células estromais do microambiente é que produzem a maior parte de KYN necessária para o imunoescape de células de melanoma.

O KA é considerado um metabólito imunossupressor associado a invasão tumoral (Sagan *et al.*, 2012). O metabólito foi secretado apenas por SK-MEL-147 na presença de IFN- γ , que diminuiu o consumo do KA presente no meio por UACC-62 e melanócitos. O aumento de KA em células tratadas com IFN- γ já havia sido reportado (Kanth, Lavanya e Srinivas, 2009). No microambiente tumoral, em que IDO parece estar ativada, a síntese de KYN e conseqüente KA é capaz de diminuir a secreção de TNF- α por células mononucleares (Tiszlavicz *et al.*, 2011). Apesar da descrição do aumento considerável (aproximadamente 10 vezes) das concentrações de KA em meio de cultura de fibroblastos tratados com IFN- γ (Asp, *et al*, 2011), em nosso trabalho observamos que IFN- γ apenas diminuiu o consumo de KA do meio de cultura.



Figura 17: Efeito de IFN-γ sobre a via catabólica das quinureninas (via KYN) em linhagens tumorais de melanoma humano e em células da pele (melanócitos e fibroblastos dérmicos). Em círculos vermelhos pode-se observar as concentrações basais dos metabólitos e em quadrados azuis as concentrações dos metabólitos na presença de IFN-γ.
A adição de IFN- γ conduziu a secreção de HK somente nos melanócitos primários. Essa é uma das diferenças mais proeminentes entre as células transformadas e as não-transformadas desse estudo. Como apresentado, HK é capaz de suprimir a proliferação de linfócitos e induzir o fenótipo regulatório nessas células (Zaher *et al.*, 2011). Conseqüentemente, a síntese e excreção de HK e KYN por células normais pode ser o maior determinante do imunoescape por células tumorais. Uma observação relevante é a síntese de HK por células epiteliais em concentrações superiores à própria KYN quando induzidas por IFN- γ (Mailankot e Nagaraj, 2010), o que não ocorreu com nenhuma célula do estudo.

O HK glicosilado é considerado o principal filtro luminoso derivado de Trp nas lentes oculares humanas e tem habilidade de absorver UVA e gerar oxidação de ácido ascórbico (Ortwerth, Bhattacharyya e Shipova, 2009). É interessante observar que o IFN- γ é relacionado a pigmentação em pele exposta a luz UV (Natarajan, Vivek T. *et al.*, 2014). Junto, esses achados suportam a função do IFN- γ em combater o dano mediado por luz UV ao induzir o metabolismo de Trp. Se for verdade, esse mecanismo parece ser perdido nas células transformadas.

O IFN- γ afetou a produção de AA de maneira similar a KYN, enquanto que a síntese de HAA foi apenas induzida significativamente em melanócitos. Ambas moléculas, AA e HAA, podem autooxidar e gerar radicais antranilil que, como a KYN, podem interagem com o AhR (Chung e Gadupudi, 2011), que entre outras funções é responsável pelo aumento da proliferação tumoral e pela regulação da melanogênese (Luecke *et al.*, 2010). A resposta mediada por IFN- γ em aumentar HAA na cultura de melanócitos pode também promover imunotolerância já que é conhecido que HAA altera a proliferação homeostática de linfócitos T CD8 (Weber *et al.*, 2006) e está envolvido com a etiologia do câncer de bexiga (Teulings *et al.*, 1973). Além, HAA e

51

HK podem inibir a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias em ambos os fenótipos de macrófagos (-1 e -2)(Briend *et al.*, 2014). Por outro lado, HK e HAA possuem forte atividade antioxidante que é importante para processos como a inflamação tumoral.

Além das atividades em imunossupressão de IDO, acredita-se que a indução da via KYN seja responsável por manter altos os níveis de NAD⁺ em processos inflamatórios (Leppanen e Oka, 1963). Além disso, a re-síntese de NAD⁺ é crucial para a proliferação contínua de células tumorais (Chiarugi *et al.*, 2012). Apesar disso, IFN- γ não afetou a abundância de nenhum dos substratos da síntese de NAD⁺ - QA, NA e NAM, em nenhuma das células estudadas.

Com relação à via SER (Figura 18), o IFN- γ não foi capaz de alterar a produção de SER nem de seu metabólito HIAA, com exceção de UACC-62 em que IFN- γ induziu o catabolismo de SER e conseguinte síntese de HIAA. Um efeito oposto, diminuição das concentrações séricas de HIAA, foi reportado em pacientes com melanoma tratados com IFN-2 α (Van Gool *et al.*, 2004). O efeito em UACC-62 de induzir a catálise de SER e formação de HIAA pode ser devido a indução da MAO por IFN- γ , efeito ainda não descrito. IFN- γ não foi capaz de alterar a síntese e catabolismo de nenhum metabólito da via das triptaminas (Figura 19).



Figura 18: Efeito de IFN- γ sobre a via SER em linhagens tumorais de melanoma humano e em células da pele (melanócitos e fibroblastos dérmicos). Em círculos vermelhos pode-se observar as concentrações basais dos metabólitos e em quadrados azuis as concentrações dos metabólitos na presença de IFN- γ .



Figura 19: Efeito de IFN- γ sobre a via das triptaminas em linhagens tumorais de melanoma humano e em células da pele (melanócitos e fibroblastos dérmicos). Em círculos vermelhos pode-se observar as concentrações basais dos metabólitos e em quadrados azuis as concentrações dos metabólitos na presença de IFN- γ .



Efeito de IFN-y sobre linhagens tumorais de melanoma humano

Esquema 1: Resumo dos efeitos de IFN- γ sobre o metabolismo de Trp em linhagens tumorais de melanoma humano. IFN- γ induz o catabolismo de Trp pela via KYN, induzindo a síntese de KYN e AA, majoritariamente.



Efeito de IFN-y sobre células da pele: monócitos e fibroblastos

Esquema 2: Resumo dos efeitos de IFN- γ sobre o metabolismo de Trp em células normais da pele: fibroblastos e melanócitos. IFN- γ induz o catabolismo de Trp via KYN, em maior intensidade que nas células tumorais, induzindo a formação de HAA e HK, especificamente.

4.2. Efeito da adição de 1-DL-MT sobre melanomas e células normais da pele.

Ao avaliarmos o efeito direto da mistura racêmica de 1-MT nas culturas celulares (Figura 20), observamos que o tratamento gerou um aumento significativo das concentrações de Trp no meio de cultura das células do estudo. Mesmo na análise do metabolismo intracelular, houve aumento das concentrações de Trp intracelular no tratamento com 1-MT. Sabendo que Trp é um aminoácido essencial e que células humanas não são capazes de sintetizar tal aminoácido, procuramos na literatura algum estudo com 1-MT que mostrasse tal efeito. Foi quando descobrimos um trabalho que havia sido publicado semanas antes por (Schmidt *et al.*, 2012), que descreve que lotes de diferentes fabricantes de 1-MT estão contaminado com Trp, que é substrato da síntese química do inibidor. Ou seja, o inibidor clássico da enzima IDO vem contaminado com o substrato da mesma enzima.

Na tentativa de avaliar a contaminação dos lotes utilizados nesse estudo, soluções 200 μ M de 1-DL-MT, 1-D-MT e 1-L-MT (todos obtidos da empresa Sigma, Alemanha) foram aplicadas no cromátografo para detecção e quantificação de Trp contaminante. As contaminações obtidas foram de, aproximadamente, 1,25 % de Trp em 1-DL-MT (Lote #MKBC7435V – 97% de pureza), 6,08 % de Trp em 1-L-MT (#MKBF4000V – 95% de pureza) e 2,153% de TRP em 1-D-MT (Lote #MKBH8464V – 95 % de pureza).



Figura 20: Efeito de 1-MT sobre a via KYN em linhagens tumorais de melanoma humano e em células da pele (melanócitos e fibroblastos dérmicos). Em círculos vermelhos pode-se observar as concentrações basais dos metabólitos e em quadrados azuis as concentrações dos metabólitos na presença de 1-MT.

Interessados no efeito da contaminação na concentração final de Trp no meio, foram adicionadas concentrações de 1 mM dos diferentes enantiômeros e da mistura racêmica de 1-MT ao meio de cultura utilizado nos experimentos (Figura 21). A disponibilidade de Trp – substrato inicial do estudo do metabolismo, encontra-se muito diferente nos grupos estudados, o que explica a obtenção do aumento das concentrações de Trp nas células tratadas com 1-DL-MT.

Desde a descrição da atividade inibitória de 1-DL-MT, muitos trabalhos utilizaram-no como mistura racêmica e os racematos separadamente. Nunca antes do trabalho de Schmidt, *et al*, 2012, havia sido reportada uma contaminação com Trp, já que na maioria dos trabalhos se reporta a inibição enzimática de IDO pela diminuição das concentrações de KYN. Toda a literatura até o presente momento tem utilizado 1-DL-MT, com aproximadamente 95% a 97% de pureza, que foram os mesmos reagentes utilizados nesse estudo.



Figura 21: Contaminação de Trp após adição de 1 mM de 1-MT no meio de cultura RPMI (contendo 10% SFB) utilizado nos experimentos celulares. (***, p<0,001).

Não só a mistura racêmica apresentou contaminação, como também as formas L e D de 1-MT, com maior contaminação em 1-L-MT, o que faz com que comparemos os resultados já publicados para essas moléculas na inibição de IDO *in vitro* e *in vivo*. Talvez, o fato de 1-L-MT apresentar melhor inibição de IDO e inferior capacidade de redução de tumores sólidos, se deva ao fato de que as concentrações que 1-L-MT atinjam no microambiente tumoral sejam inferiores, e devido ao fato do Trp contido em 1-L-MT – mas não o Trp contido em 1-D-MT (D-Trp) – ser proteinogênico, haja participação nessa resposta contraditória. A exemplo dos efeitos de Trp contido em 1-MT, o Trp presente em lotes de 1-L-MT é capaz de antagonizar a inibição de células T mediada por IDO (Schmidt *et al.*, 2012).

Mesmo com a descrição de que 1-MT é capaz de induzir a expressão de IDO1 em células tumorais (Opitz, Christiane A. *et al.*, 2011), em melanomas 1-MT não alterou as concentrações basais de KYN, indicando que ou não houve indução da expressão de IDO1, ou essa proteína é expressa sem atividade catalítica. Apesar de não alterar KYN, 1-MT foi capaz de alterar os seus metabólitos diretos KA, AA e HK. O aumento na produção de KA na maioria das células estimuladas com 1-MT foi mais evidente que no estímulo por IFN- γ , onde apenas se observa o efeito em SK-MEL-147. Diferente para o que observamos nas células tumorais e em melanócitos, em modelo murino de estresse induzido, a administração de 1-MT não alterou as concentrações (plasmáticas) de KA (Kiank *et al.*, 2010).

O ácido xanturênico (XA), que é considerado um dos metabólitos de Trp com atividade antioxidante (Christen, Peterhans e Stocker, 1990) e foi recentemente descrito como agente quelante *in vivo* (Lima *et al.*, 2012) apresenta-se em concentrações aumentadas em três linhagens estudadas quando tratadas com 1-MT. Não se observam alterações nos metabólitos finais da via KYN, com exceção de NA em UACC-62, em que 1-MT impediu seu consumo do meio de cultura significativamente (Zaher *et al.*, 2011). NA pode impedir a adesão de monócitos à células epiteliais (Tavintharan, Lim e Sum, 2009) e é capaz de reverter lesões em células da pele causadas por UV (Bermudez *et al.*, 2011). Porém, apesar de diversas funções, talvez sua participação no desenvolvimento tumoral seja principalmente na síntese de NAD⁺.

Com relação a via SER, 1-MT apenas alterou as concentrações de HIAA (Figura 22), impedindo sua síntese e induzindo o seu consumo do meio de cultura em todas as células, com exceção dos melanócitos, chegando a, aproximadamente, 10% dos valores encontrados no basal. Tal resultado, somado a um trabalho anterior do grupo, onde publicamos de forma inédita que 1-MT induz a síntese de melatonina MLT nas mesmas linhagens tumorais, mostra que na presença de 1-MT, a SER, ao invés de ser direcionada para HIAA, é direcionada para a síntese de MLT (Moreno *et al.*, 2013). Tal efeito comprova efeitos secundários de 1-MT sobre o metabolismo de Trp.

A via das triptaminas, representada por TRY e seu metabólito IAA não parece sofrer com o estímulo na maioria das células (Figura 23). Um efeito observado foi a capacidade em induzir a síntese de IAA em UACC-62. Apesar de IAA ser um reconhecido indutor da capacidade fagocítica de neutrófilos em ratos e protetor da gênese de carcinoma hepático (Mourao *et al.*, 2009) não se conhece seu papel no processo tumoral. Apesar dos resultados obtidos demonstrarem a capacidade de 1-MT em atuar diretamente no metabolismo, ampliando as possibilidade deste em participar de diferentes processos biológicos, esses resultados devem ser analisados sob a ótica da contaminação de Trp, que é o substrato para a síntese de todos os compostos do estudo.



Figura 22: Efeito de 1-MT sobre a via SER em linhagens tumorais de melanoma humano e em células da pele (melanócitos e fibroblastos dérmicos). Em círculos vermelhos pode-se observar as concentrações basais dos metabólitos e em quadrados azuis as concentrações dos metabólitos na presença de 1-MT.



DMT

Figura 23: Efeito de 1-MT sobre a via das TRY em linhagens tumorais de melanoma humano e em células da pele (melanócitos e fibroblastos dérmicos). Em círculos vermelhos pode-se observar as concentrações basais dos metabólitos e em quadrados azuis as concentrações dos metabólitos na presença de 1-MT.



Efeito de 1-MT sobre linhagens de melanoma e células da pele

Com intuito de avaliar o potencial inibitório de 1-MT sobre a formação de KYN, tratamos as células com 1-MT conjuntamente com IFN- γ (Figura 24). Mesmo com a contaminação de Trp em 1-DL-MT podemos observar que as concentrações de KYN são inferiores quando IFN- γ e 1-MT são adicionados conjuntamente às células, demonstrando a capacidade inibitória de 1-DL-MT tanto nos melanomas, como nas células da pele. Ao dividirmos as concentrações de KYN obtidas no grupo IFN- γ sob as concentrações obtidas no grupo IFN- γ com 1-MT, a fim de testarmos a capacidade inibitória de 1-MT, a fim de testarmos a capacidade inibitória de 1-MT inibe de forma variável a produção de KYN pelas células estudadas: valores aproximados dessa razão são: 8,3; 4,0; 2,9; 2,5; 1,7, 1,6 e 1,5 vezes, respectivamente correspondentes a UACC-62, fibroblastos, SK-MEL-19, WM-1366, melanócitos, SK-MEL-29 e SK-MEL-147. O efeito inibitório de 1-MT já havia sido reportado em outras células tumorais (Hou *et al.*, 2007).

Esquema 3: Efeito de 1-MT sobre o Metabolismo de Trp em linhagens tumorais de melanoma humano e células da pele. 1-MT induz a formação de AA, KA e XA. Alem disso, 1-MT é capaz de inibir a formação de HIAA, e direcionar a formação de MLT (resultado publicado por nosso grupo em Moreno, et al, 2013).



Figura 24: Efeito de IFN- γ (círculos vermelhas) e de IFN- γ e 1-MT conjuntamente (quadrados azuis) sobre a via KYN em linhagens tumorais de melanoma humano e em células da pele (melanócitos e fibroblastos dérmicos).

KYN foi o metabólito mais induzido no tratamento com IFN- γ e mesmo com a inibição por 1-MT de sua síntese, esse tratamento associado a IFN- γ não foi capaz de inibir a síntese de outros compostos. Como exemplo tem-se AA, que só teve suas concentrações decrescidas na cultura de SK-MEL-147 e nos melanócitos. 1-MT inibiu a formação de HAA em melanócitos, mas não foi capaz de inibir a formação de HK pela mesma célula, não alterando outros metabólitos quando em conjunto com IFN- γ .

Na via SER, 1-MT manteve seu efeito em impedir a síntese de HIAA mesmo na presença de IFN-γ (Figura 25). Apesar das concentrações de TRY e SER não alterarem com os estímulos, as concentrações de seus metabólitos diretos IAA (Figura 26) e HIAA, apresentam-se alteradas com os tratamentos em algumas das células, demonstrando que as diferentes rotas podem se intercomunicar.

Os gráficos que apresentam os resultados das quantificações intracelulares (metaboloma) não serão apresentados devido a alta similaridade com os resultados obtidos para o meio de cultura e, apesar de quantificarmos alguns metabólitos, o sedimento celular demonstrou-se insuficiente para completa análise do metabolismo. Ademais, focamo-nos em apresentar os dados de secretoma, já que são os metabólitos excretados que serão úteis no microambiente para regulação dos efeitos de imunoescape tumoral.



Figura 25: Efeito de IFN- γ (círculos vermelhas) e de IFN- γ e 1-MT conjuntamente (quadrados azuis) sobre a via SER em linhagens tumorais de melanoma humano e em células da pele (melanócitos e fibroblastos dérmicos).



DMT

Figura 26: Efeito de IFN- γ (círculos vermelhas) e de IFN- γ e 1-MT conjuntamente (quadrados azuis) sobre a via TRY em linhagens tumorais de melanoma humano e em células da pele (melanócitos e fibroblastos dérmicos.



Efeito de 1-MT sobre sobre linhagens tumorais e células da pele tratadas com IFN-γ.

Esquema 4: Efeito de 1-MT sobre o Metabolismo de Trp em linhagens tumorais de melanoma humano e células da pele tratadas com IFN- γ . 1-MT inibe a síntese de KYN e HIAA em todas as células e de HK e HAA pelas células da pele. Mesmo na presença de IFN- γ , 1-MT é capaz de induzir a síntese de KA e XA.

4.3. Efeito dos enantiômeros de 1-MT, 1-D-MT e 1-L-MT, no metabolismo de Trp em melanoma SK-MEL-19 e em fibroblastos dérmicos.

No intuito de testar a atividade inibitória dos enantiômeiros de 1-MT separadamente, 1-D-MT e 1-L-MT, o mesmo experimento foi realizado em fibroblastos (Figura 27) e em SK-MEL-19 (Figura 28) que foram tratados com os enantiômeros puros, e não com a mistura racêmica. Não obstante as diferentes contaminações de Trp nos racematos – conforme apresentado anteriormente, podemos observar que 1-L-MT foi capaz de inibir a formação de KYN na presença de IFN- γ , aproximadamente 4 vezes mais que 1-D-MT em SK-MEL-19.

Efeitos similares de 1-L-MT e 1-D-MT foram observados nas quantificações de HIAA, em que os dois inibidores foram capazes de diminuir a concentração do metabólito nas duas células estudadas. D- e L-1-MT também foram capazes de aumentar as concentrações de XA e de HAA no melanoma SK-MEL-19, sendo que o último metabólito não foi observado nos fibroblastos. Podemos observar também que

independente da célula estudada, 1-D-MT foi capaz de aumentar as concentrações de AA e de TRY e somente nos fibroblastos aumentar as concentrações de NA. Ao adicionarmos 1-L-MT observamos somente aumento em IAA em ambas as células.



Efeito dos enantiômeros de 1-MT (D- e L-) sobre o metabolismo de Trp em cultura de fibroblastos

Figura 27: Efeito de 1-D-MT e 1-L-MT sob o metabolismo do Trp em fibroblastos dérmicos.



Efeito dos enantiômeros de 1-MT (D- e L-) sobre o metabolismo de Trp em cultura de SK-MEL-19

Figura 28: Efeito de 1-D-MT e 1-L-MT sob o metabolismo do Trp em SK-MEL-19.

Neste mesmo experimento procuramos avaliar qual das formas racêmicas apresentou melhor inibição da síntese de KYN comparando o resultado com a mistura racêmica (Figura 29).



Figura 29: Efeito dos enantiômeros 1-D-MT e 1-L-MT e da mistura racêmica 1-DL-MT sobre o metabolismo do Trp em fibroblastos e SK-MEL-19.

Apesar de 1-D-MT ser reconhecido como melhor agente antitumoral (Schmidt *et al.*, 2012), 1-D-MT não apresentou inibição da formação de KYN tanto em SK-MEL-19 como nos fibroblastos, efeito também observado em células HeLa tratadas com IFN- γ (Lob *et al.*, 2009). Logo, apesar do uso da isoforma D- do composto ser aplicada em estudos clínicos, o mesmo não deve ter como mecanismo atribuído a inibição de IDO, nem em tumores que expressam IDO2 (Lob *et al.*, 2009). Uma possibilidade se dá pela sua habilidade de interagir com sinalização mediada por TLR em células dendríticas, um mecanismo independente de IDO (Agaugue *et al.*, 2006) ou pela mais recente descrição de seu potencial inibitório de mTOR (Metz *et al.*, 2012).

Ao compararmos a atividade inibitória de todas as moléculas testadas, observase que a mistura racêmica foi a que mais impediu a formação de KYN. Talvez, 1-L-MT não tenha sido o melhor inibidor devido a mais alta contaminação com Trp, apresentada anteriormente. Esta é a primeira descrição das alterações metabólicas causadas pelos isômeros de 1-MT no metabolismo de Trp.

CAPÍTULO 2. Estudo do metabolismo de Trp em células imunológicas.

4.4. Metabolismo basal de Trp e o efeito da adição de IFN-γ em células imunológicas.

As células do sistema imunológico consumiram Trp de maneiras muito similares, com exceção de MDM-1 (M Φ 1) e nos neutrófilos (N)(Figura 30). O macrófago M Φ 1 consome completamente o Trp do meio de cultura, o que já é esperado já que essa célula é tratada, durante o protocolo de diferenciação, com IFN- γ . Conforme apresentado, a depleção de Trp via IDO em macrófagos é parte das atividades citostáticas e antiproliferativas em linfócitos mediadas por IFN- γ (Munn *et al.*, 1999; Schrocksnadel *et al.*, 2006). Além do mais, a depleção de Trp modifica os efeitos de IFN- γ em macrófagos. Em culturas depletadas de Trp, a indução de NO sintase (iNOS) mediada por IFN- γ é restringida, demonstrando que essa redução da disponibilidade de Trp por M Φ 1 pode modificar a função dos macrófagos e possivelmente o resultado final da resposta imunológica (Chiarugi *et al.*, 2003). Esse consumo exacerbado de Trp parece ser um dos mecanismos de controle das atividades de macrófagos, já que do mesmo modo, o óxido nítrico (NO), produto da catálise mediada por iNOS, inibe a atividade de IDO mediada por IFN- γ (Thomas, Mohr e Stocker, 1994). Depois de M Φ 1, os monócitos foram as células que mais consumiram Trp do meio de cultura, efeito que já é reportado para monócitos de diferentes doadores (Schrocksnadel *et al.*, 2006). Já os neutrófilos (N) não consumiram Trp do meio de cultura durante as 48 h de cultivo.

A formação de KYN segue o perfil de consumo de Trp em M Φ 1. Nenhuma das outras células estudadas sintetiza KYN na condição basal. Mesmo em mDC, onde há indução da maturação com TNF- α e é considerada uma das principais apresentadoras de antígenos (Guermonprez *et al.*, 2002), não se observa indução do catabolismo de Trp pela via KYN. De fato, em células dendríticas, o estímulo isolado com TNF- α não é capaz de induzir a expressão de IDO (Braun, Longman e Albert, 2005). Apenas quando associado a outros indutores de IDO, como IFN- γ , TNF- α foi capaz de atuar de modo sinérgico na indução da expressão de IDO e conseguinte formação de KYN (Robinson, Hale e Carlin, 2005).



Figura 30: Via KYN em monócitos de sangue periférico humano (Mono), macrófagos derivados de monócitos (M Φ 1, M Φ 2 e M Φ 7), células dendríticas imaturas e maduras (Dim e Dm), linfócitos (L Φ) e neutrófilos (N).

Um fato encontrado para linhagens tumorais de melanoma e que se repete para as células imunológicas é o consumo quase que completo de KA do meio de cultura, com exceção dos diferentes macrófagos que consumiram menos KA do meio. KA é um ligante do receptor GPR35, encontrado em células imunológicas e participa dos mecanismos de imunomodulação (Wang *et al.*, 2006). Já AA é sintetizado pela maioria das células imunológicas no estado basal, o que não acontece nas células tumorais. Apesar das atividades antiproliferativas de vários metabólitos da via KYN, AA não possui efeitos sobre a proliferação de linfócitos (Bauer *et al.*, 2005). A relevância da síntese desse metabólito ainda está por ser elucidada.

XA é consumido do meio de cultura, com exceção dos neutrófilos, que sintetizaram e excretaram esse metabólito para o meio de cultura. A síntese de XA por células do sistema imunológico nunca fora antes reportada. Esse resultado curioso corrobora o fato de XA ser encontrado em patologias com forte neutrofilia, como em líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (Nurcombe, Bucknall e Edwards, 1991).

A síntese de QA por macrófagos (Heyes, Saito e Markey, 1992) e células da microglia (Heyes *et al.*, 1996) já foi reportada. No presente estudo, acrescentamos que a síntese de QA ocorre apenas para o subtipo M Φ 2 e para a população não-diferenciada M7, sendo que essas células podem ser a fonte de QA, para que as outras células do microambiente tumoral sintetizem NAD⁺, que é o que ocorre em gliomas e está associado com malignidade desse tipo tumoral (Sahm *et al.*, 2013). Outro fato interessante é que a síntese de QA em determinados microambientes pode gerar morte das células estromais, como é o caso do sistema nervoso, onde o QA produzido por macrófagos podem gerar morte de células corticais, num mecanismo dependente de receptores glutamato (Chiarugi *et al.*, 2001). Essa atividade neurotóxica de QA é muito conhecida (Foster *et al.*, 1984) e está relacionada diversas patologias (Adams *et al.*, 2012).

Outro resultado interessante é que no fenótipo imaturo as dendríticas são capazes de sintetizar QA, o que não acontece pela célula madura. Talvez isso seja relacionado ao fato de iDCs serem células residentes, com baixa atividade migratória (Gunzer *et al.*,

2000) e participem do metabolismo do microambiente, e quando ativadas – indução de maturação que tem entre suas caraterísticas, alta atividade migratória; participam de outros processos bioquímicos. Com relação ao outro substrato da síntese de NAD⁺, NA é totalmente consumido pelas dendríticas e em menor proporção pelas outras células. NA é sintetizado apenas por M Φ 2 e M7, demonstrando ainda mais o potencial dessas células em subsidiar a síntese de NAD⁺ no microambiente tumoral. Além disso, NAD⁺ é capaz de regular a síntese de citocinas como TNF- α e IL-6 em fagócitos mononucleares, com implicação em várias patologias (Van Gool *et al.*, 2009), o que reitera ainda mais a importância do estudo do metabolismo nos diferentes fenótipos de macrófagos e dendríticas.

Com relação a via SER, todas as células consumiram SER do meio de cultura (Figura 31). Esse consumo por macrófagos está relacionado a suas atividades imunoregulatórias (Jackson *et al.*, 1988) e fagocíticas (Freire-Garabal *et al.*, 2003). Em dendríticas, a captação de SER está relacionada às funções de interação com células T no tecido linfóide. A habilidade de DCs seqüestrarem SER pode influenciar diretamente as funções de linfócitos, já que esses são conhecidos por serem sensíveis à alterações nas concentrações de SER (O'connell *et al.*, 2006; Ahern, 2011).

O consumo de SER é seguido pela síntese para diferentes metabólitos de acordo com o tipo celular: monócitos e neutrófilos sintetizam HIAA, enquanto M2 e M7 sintetizam melatonina. Linfócitos sintetizam ambos metabólitos de SER, HIAA e MLT. A síntese de MLT por linfócitos, assim como seu papel na imunomodulação, já foi descrita (Carrillo-Vico *et al.*, 2004).



Figura 31: Via SER em monócitos de sangue periférico humano (Mono), macrófagos derivados de monócitos (M Φ 1, M Φ 2 e M Φ 7), células dendríticas imaturas e maduras (Dim e Dm), linfócitos (L Φ) e neutrófilos (N).

Mais uma interessante alteração metabólica entre M Φ 1 e M Φ 2 foi a síntese de MLT por M Φ 2. O fenótipo M Φ 2 está relacionado ao processo de remodelamento tecidual, reparo e cicatrização (Biswas e Mantovani, 2010) e a síntese de melatonina também pode estar relacionada a essas atividades, já que MLT, além de possuir efeitos imunomodulatórios e ser conhecida pelo seu forte potencial antioxidante, participa do reparo em danos na pele (Fischer *et al.*, 2008) e na cicatrização (Soybir *et al.*, 2003). Muito se tem estudado sobre as principais características dos dois fenótipos de

macrófagos M1 e M2 (Biswas e Mantovani, 2012) e nosso estudo colabora nessa descrição ao mostrar características metabólicas de Trp distintas (Esquema 5).



Esquema 5: Adaptado de (Biswas e Mantovani, 2012). Adicionamos as assinaturas metabólicas de M1 e M2, ao sintetizarem especificamente KYN e AA e QA e MLT respectivamente.

Dentre os efeitos imunomodulatórios mediados por MLT, os mais estudados são estimular a produção de células *Natural Killer*, monócitos e linfócitos, alterar o balanço de linfócito T helper Th-1 e Th-2 e induzir a produção de citocinas importantes como as interleucinas 2, 6 e 12 (Srinivasan *et al.*, 2008) e, além disso, inibir a produção de IFN- γ mediada por PHA em linfócitos (Finocchiaro *et al.*, 1988).

AFMK, o metabólito direto de MLT é sintetizado por M Φ 1, M Φ 2 e principalmente M Φ 7. A oxidação de MLT a AFMK em macrófagos ocorre principalmente em um mecanismo dependente de mieloperoxidase e independente de IDO (Rodrigues *et al.*, 2003). Um dado interessante é que tanto MLT como seu metabólito AFMK tem, entre outros alvos, os neutrófilos, células em que a produção de TNF- α e IL-8 induzida por LPS é inibida na presença desses metabólitos (Silva, S., Rodrigues, M., Ximenes, V., *et al.*, 2004). Apesar da síntese de AFMK, o seu metabólito desformilado AMK não foi sintetizado por nenhuma das células do estudo.

A síntese de quinuramina (KYM) por células do sistema imunológico ainda não foi reportada. Apenas monócitos e M Φ 7 possuem a habilidade de sintetizar esse metabólito, que é o principal metabólito que inter-relaciona via KYN com a via SER, demonstrando essa habilidade em células imunológicas.

O estudo do metabolismo basal da via TRY (Figura 32) mostra que as células dendríticas e monócitos são capazes de sintetizar IAA e apenas M Φ 7 é capaz de sintetizar DMT. Sabendo que IAA é agonista do AhR (Heath-Pagliuso *et al.*, 1998), nossos resultados demonstram em primeira mão a habilidade de células dendríticas sinalizarem a ativação do AhR em outras células, imunológicas ou não.



Figura 32: Via TRY em monócitos de sangue periférico humano (Mono), macrófagos derivados de monócitos (M Φ 1, M Φ 2 e M Φ 7), células dendríticas imaturas e maduras (Dim e Dm), linfócitos (L Φ) e neutrófilos (N).



Esquema 6: Metabolismo de Trp basal de células imunológicas: monócitos e suas células derivadas macrófagos M1 e M2 e células dendríticas iDC e mDC, linfócitos e neutrófilos. Podemos avaliar que as células consomem diferentes metabólitos do Trp e produzem em seu metabolismo basal compostos das diversas rotas metabólicas do aminoácido.

Sabendo do essencial papel de IFN-γ na ativação da resposta imunológica e na indução do catabolismo de Trp nessas células, gerando imunotolerância e conseqüente imunoescape, também estudamos o metabolismo de Trp nas células imunológicas tratadas com essa citocina. E, sabendo da ação de fitohemaglutinina mitogênica (PHA) sobre a ativação de linfócitos, e da descrição de que PHA induz a síntese de MLT em linfócitos, essas células foram tratadas com PHA para que avaliássemos todo o metabolismo de Trp com esse tratamento. Também estudamos o efeito de PHA sobre o metabolismo de Trp em neutrófilos já que PHA pode induzir a citotoxicidade mediada por essas células (Dallegri *et al.*, 1983).



Figura 33: Efeito de IFN- γ (quadrados azuis) e de PHA (triângulos verdes) sobre a via KYN em células imunológicas. O basal é apresentado em círculos vermelhos.

O tratamento com IFN- γ levou a depleção de Trp no meio de cultura de monócitos e suas células derivadas, dendríticas e macrófagos (Figura 33). Aqui, podemos ampliar a discussão realizada para a depleção de KYN encontrada apenas no metabolismo basal de M Φ 1 para as outras células, já que as dendríticas também depletaram o Trp do meio, e podem, na presença de IFN- γ , induzir a supressão da proliferação de linfócitos (Hwu *et al.*, 2000; Terness *et al.*, 2002). Assim, o impacto do consumo e depleção de Trp sobre células do sistema imune faz parte dos principais mecanismos dos processos de tolerância, imunoescape e progressão tumoral (Kim, Emi e Tanabe, 2007; Munn e Mellor, 2007; Swann e Smyth, 2007), e aparentemente, as células imunológicas e as células da pele somadas, no microambiente em melanomas, são capazes de induzir esses fenômenos.

O tratamento com IFN- γ induziu a formação de KYN em todas as células com exceção de M Φ 1 e neutrófilos. Como para a geração de M Φ 1, as células são tratadas com IFN- γ , o posterior tratamento com a mesma citocina não induz maior formação de KYN. Os monócitos foram as células mais responsivas a IFN- γ ao produzir as mais altas concentrações de KYN, demonstrando que esse tipo celular também pode atuar na supressão de linfócitos T, o que pode ocorrer via catabolismo de Trp em transplante de medula (Hainz *et al.*, 2005). Outro resultado que chama atenção é a baixa habilidade das células dendríticas em produzir KYN. Apesar dessa produção ser baixa na presença de IFN- γ , a indução de IDO em dendríticas requer indução do receptor AhR (Nguyen *et al.*, 2010), o que pode ocorrer via outros metabólitos da via KYN ou pela própria KYN de outros tipos celulares, como as células da pele. Já o PHA foi capaz de induzir a formação de KYN da mesma maneira que IFN- γ em linfócitos, corroborando estudos anteriores (De Ravin *et al.*, 2010).

Ao compararmos as concentrações de KYN produzidas pelas células da pele com as células imunológicas, podemos observar que as células normais da pele produzem muito mais KYN do que as células imunológicas, o que avigora a hipótese de que as células normais peri-tumorais é que colaboram, em sua maioria, para o imunoescape de melanomas. Um resultado interessante é que ambos fenótipos de dendríticas apresentaram as mesmas concentrações de KYN quando tratadas com IFN- γ . A co-estimulação de TNF- α com IFN- γ gera um aumento sinérgico na indução de IDO em dendríticas, comparado com o tratamento de IFN- γ isoladamente (Robinson, Hale e Carlin, 2005). Porém, o tratamento com TNF- α na diferenciação com posterior indução do metabolismo com IFN- γ não foi capaz de gerar esse feito sinérgico, já que as concentrações de KYN para ambos fenótipos tratadas com IFN- γ foram similares.

Somente em M Φ 2 o tratamento com IFN- γ impediu o consumo de KA do meio de cultura. Apesar de KA também ser um ligante do receptor AhR (Dinatale *et al.*, 2010), em apenas uma (melanoma SK-MEL-147) das quinze células estudadas o tratamento com IFN- γ foi capaz de induzir a síntese de KA, demonstrando que provavelmente o ligante endógeno de AhR que produza seus efeitos imunomodulatórios seja o metabólito KYN.

Assim como em melanomas, IFN- γ foi capaz de induzir a síntese de AA em M Φ 2 e em ambos fenótipos de células dendríticas. Apesar de AA ainda não ter uma relevância biológica descrita no microambiente tumoral, o excesso desse metabólito no microambiente em tumores de pele, como os melanomas, onde há maior penetrabilidade de luz UV, pode haver formação de radicais antranilil que possuem potencial carcinogênico e também podem se ligar ao receptor AhR e gerar supressão do sistema imunológico (Chung e Gadupudi, 2011).

Apesar da relevância de AA ainda não ter sido descrita no tumor, vale ressaltar que o ácido antranílico tem sido grupo farmacofórico para diversos agentes antitumorais análogos metabólicos, como o tranilast. O tranilast é um agente quimioterápico com mecanismo de ação ainda não completamente elucidado, mas capaz de suprimir a expressão e atividade de TGF-β (Darakhshan e Pour, 2014), importante citocina nos processos de invasão, regulação imunológica e modificação do microambiente tumoral (Massague, 2008). Devido a forte relação de derivados antranílicos e dos metabólitos do Trp com o sistema imune, talvez AA tenha também atividades imunomodulatórias.

Diferente do que foi encontrado para melanomas, onde IFN-y não alterou as concentrações basais de XA, nas células imunes derivadas de monócitos a citocina induziu o consumo completo desse metabólito do meio de cultura. Embora IFN-γ tenha apenas inibido o consumo de NA em M Φ 1, foi em QA que observamos seu maior efeito, induzindo a síntese de QA em todas as células derivadas de monócitos, principalmente em dendríticas imaturas, que a secreção desse metabólito chega a ser três vezes superior a dos níveis basais. Em melanomas e células normais da pele IFN-y não foi capaz de alterar a síntese de QA, mas talvez a síntese desse metabólito esteja relacionada as células imunológicas nos processos inflamatórios para a alimentação do metabolismo de nicotinamida e NAD⁺, crucial para a proliferação contínua de células tumorais (Chiarugi et al., 2012). A capacidade da microglia em sintetizar e excretar esse metabólito para o microambiente, onde células tumorais de glioma humano captam e usam para a síntese de NAD⁺ (Sahm et al., 2013) e o potencial de macrófagos em sintetizar esse metabólito (Heyes, Saito e Markey, 1992) somados aos nossos resultados, reforçam as enzimas do metabolismo de NAD+ como alvo metabólico e imunoterápico para o tratamento de alguns tumores malignos (Chiarugi et al., 2012).

IFN- γ não direcionou a via SER para formação de HIAA, mas sim para a síntese de KYM principalmente em M Φ 2 e linfócitos (Figura 34). A síntese de KYM por essas células na presença de IFN- γ demonstra que as vias KYN e SER em células do sistema imune podem se intercomunicar, e gerar diversos efeitos imunomodulatórios. IFN- γ também impediu a síntese de MLT provavelmente por esgotamento de Trp, mas 80 também por indução da sua oxidação, já que há um aumento do seu metabólito AFMK em M Φ 2, dendríticas imaturas, linfócitos e neutrofilos, esses últimos também passam a produzir AMK. Tais resultados demonstram que a forte atividade regulatória de linfócitos também se dá via metabolismo de Trp, já que MLT, AFMK e AMK afetam a atividade microbicida de neutrófilos (Silva *et al.*, 2006), possuem atividade antiinflamatória sobre macrófagos (Mayo *et al.*, 2005) e AMK e AFMK também possuem as atividades imunomodulatórias da MLT (Silva, S. O. *et al.*, 2004).

É apenas no estudo da via SER que observamos a mais importante atividade metabólica de linfócitos e neutrófilos tratados com IFN- γ e PHA. PHA foi capaz de induzir a síntese de MLT, efeito já observado por (Carrillo-Vico *et al.*, 2004), e KYM de modo mais acentuado que IFN- γ que por sua vez teve mais efeito sobre a catálise de MLT, na síntese de AFMK e AMK, como já apresentado. Devido ao fato de neutrófilos expressarem os receptores de IFN- γ , IFNGR1 e 2, que estão, entre outros processos, relacionados a quimiotaxia, o IFN- γ poderia, além de suas funções quimiotáticas no processo inflamatório, induzir o metabolismo de Trp pela via SER nessas células. O aumento de AFMK e AMK em neutrófilos pode estar muito correlacionado ao efeito de *burst* oxidativo induzido por IFN γ (Shalaby *et al.*, 1985; Ellis e Beaman, 2004) via indução de mieloperoxidase, enzima responsável por catalisar a formação desses metabólitos (Ximenes *et al.*, 2005).



Figura 34: Efeito de IFN-γ (quadrados azuis) e de PHA (triângulos verdes) sobre a via SER em células imunológicas. O basal é apresentado em círculos vermelhos.

Na via catabólica menos estudada, via TRY, IFN-γ induziu a síntese de IAA e DMT por linfócitos e de DMT por macrófagos M2 e dendríticas imaturas (Figura 35).



Figura 35: Efeito de IFN- γ (quadrados azuis) e de PHA (triângulos verdes) sobre a via TRY em células imunológicas. O basal é apresentado em círculos vermelhos.

Neutrófilos tratados com PHA também foram capazes de sintetizar DMT. Todos os resultados obtidos com análise da via TRY somados demonstram que essa via deve participar ativamente de processos inflamatórios. É descrita a habilidade de TRY ligarse ao receptor AhR e induzir sua translocação (Heath-Pagliuso *et al.*, 1998), porém não se sabe a habilidade de seus metabólitos DMT e IAA atuarem como ligante desse receptor. Apesar disso, nosso grupo de pesquisa descreveu a habilidade de DMT inibir IDO (Tourino *et al.*, 2013), o que somado aos presentes resultados demonstra que o próprio IFN- γ induz a síntese de um metabólito que possa controlar uma excessiva indução de IDO.



Efeito de IFN-γ sobre monócitos e células derivadas de monócitos: macrófagos e dendríticas.

Esquema 7: Efeito de IFN- γ sobre o metabolismo de Trp de células imunológicas: monócitos e suas células derivadas macrófagos M1 e M2 e células dendríticas iDC e mDC. IFN- γ induz ao consumo de Trp e XA pelas células e formação de KYN, AA e QA. Alem disso, IFN- γ inibe a formação de MLT.



Esquema 8: Efeito de IFN- γ sobre o metabolismo de Trp de linfócitos. IFN- γ induz a formação de KYN, TRY e IAA, além de induzir a catálise de MLT a AFMK e AMK.

4.5. Metabolismo de Trp em amostras clínicas.

Devido a morosidade na aprovação do comitê de ética para estudo de amostras clínicas, até o presente momento só foram realizadas duas análises do metabolismo de Trp: uma em nevo normal e a outra em amostra clínica de melanoma diagnosticado (Figura 36).

Embora ainda não tenhamos analisados todas as amostras clínicas, podemos observar que, apesar de KYN sérico e IDO nos linfonodos sentinela serem considerados os marcadores de malignidade de melanomas, o mesmo ocorre no microambiente tumoral, onde as concentrações de KYN foram aproximadamente 420 vezes superiores a do nevo normal. Apesar de observarmos a depleção de Trp no estudo das células tratadas com IFN-γ, não observamos depleção do mesmo no microambiente tumoral, o que faz com que acreditemos que não é a depleção de Trp que é responsável por parte dos efeitos imunoregulatórios do metabolismo, mas sim, a forte indução de KYN e seus metabólitos, KA, AA e NA que foram passíveis de serem quantificados apenas na amostra de melanoma, metabólitos esses que ou foram induzidos por IFN-γ nas células imunes (KA) ou nas células tumorais e imunes (AA). Ressaltamos também que na análise do metabolismo intracelular das linhagens tumorais e células de pele, IFN-γ induziu a captação de Trp pela maioria das células (Figura 37).



Figura 36: Vias catabólicas do Trp (via KYN (A), SER e TRY (B)) em uma amostra clínica de melanoma (cinza escuro) e um nevo normal (cinza claro).

XA apresentou o mesmo perfil que no estudo das células, não sofrendo alterações importantes. Já NA, pode ser quantificado apenas na amostra clínica, indicando a importância dessa via para a síntese de NAD⁺ no tumor.

A análise de SER apenas na amostra de melanoma, demonstra que talvez esse metabólito participe dos processos imunobioquímicos na pele, como na imunotolerância. Podemos observar uma diminuição de MLT e aumento de AFMK na amostra clínica, o que foi observado para as células imunológicas tratadas com IFN- γ .


Figura 37: Concentração intracelular de Trp em linhagens celulares de melanoma e em células normais da pele. Em quadrados azuis são apresentadas as concentrações de Trp após o tratamento com IFN-γ.



Esquema 9: Metabolismo de Trp na amostra clínica de melanoma comparada coma amostra de nevo normal. São apresentados os metabólitos que estão alterados na amostra de melanoma que não estão na pele normal.

5.0. CONCLUSÕES

Devido a forte participação de IFN-γ e do catabolismo de Trp nos mecanismos de imunoescape e conseqüente prognóstico de tumores, o estudo do consumo de Trp, atividade de IDO/TDO e formação de KYN em fluidos biológicos tem sido recorrente. Muito se tem sugerido sobre a ativação da via KYN na patofisiologia da pele/melanomas. Porém, se fazem escassos os estudos que aprofundam o conhecimento sobre as vias metabólicas do Trp em células da pele, melanomas e células imunológicas, e principalmente no microambiente tumoral.

Acreditando no envolvimento essencial de todo o metabolismo desse aminoácido na fisiologia da pele, nos mecanismos imunoregulatórios e na conversa entre sistema imunológico, células estromais e células tumorais no microambiente, principalmente em melanomas, é que nosso estudo questiona exaustivamente quais metabólitos são realmente produzidos por quais tipos celulares e em quais condições. Nesse sentido, avaliamos mais de vinte metabólitos em dezesseis tipos celulares que participam dos diversos processos fisiológicos e patológicos. Sob a ótica da pergunta que gerou o título da presente tese, as células que participam do microambiente de melanomas podem nos dizer que:

- O metabolismo basal de Trp das células não transformadas não difere do metabolismo das células transformadas;
- O consumo de TRY por melanócitos e apenas algumas linhagens tumorais pode sugerir diferentes susceptibilidades de melanomas à fototerapia;
- IFN-γ foi capaz de induzir especificamente HAA e HK em melanócitos, provavelmente devido a seus efeitos na fisiologia da pele, em um mecanismo aparentemente perdido pelas células tumorais;

- Sabendo da participação de IFN-γ no controle da pigmentação da pele em melanócitos, nosso estudo traz a hipótese de que um dos mecanismos de resposta ao dano por luz UV seja por ativação do catabolismo de Trp em células da pele;
- O forte efeito de IFN-γ nas células normais suporta a recente hipótese de que a produção de KYN peritumoral e não tumoral induza imunotolerância no microambiente de melanomas;
- 1-MT é capaz de inibir a formação de KYN mediada por IFN-γ, porém não é capaz de depletar sua síntese, resultado que quando é somados ao uso de 1-D-MT como agente imunoterápico, demonstra que essa molécula tem outros mecanismos de ação que não inibição de IDO;
- 1-MT é capaz de atuar diretamente no metabolismo de Trp, induzindo a síntese de outros metabólitos como KA, HK e XA, inclusive da via SER, demonstrando uma inter-relação metabólica;
- As células imunológicas possuem um perfil metabólico completamente diferente umas das outras: enquanto monócitos e suas células derivadas possuem maior ativação da via KYN, linfócitos e neutrófilos possuem claramente maior indução da via SER, o que pode estar relacionado a suas funções;
- Além disso, dentro das células diferenciadas de monócitos, macrófagos M2 que são amplamente associados com a malignidade tumoral apresentam um perfil metabólico completamente diferente de M1, o que também ocorre para as dendríticas maturas e imaturas;
- As análises em células tratadas com IFN-γ mostram um perfil similar ao encontrado na amostra clínica de melanoma;

- Apesar da diminuição sérica de Trp em pacientes com melanoma, as concentrações de Trp no microambiente não são inferiores da pele normal, provavelmente devido a maior captação de Trp sérico pelo tumor e células do microambiente;
- E por fim, apesar da principal diferença entre o nevo e o melanoma ser a concentração de KYN, diversas outras alterações no metabolismo de tiptofano foram observadas, o que mostra a complexa magnitude deste metabolismo na fisiopatologia da pele.

6.0. MATERIAL SUPLEMENTAR

6.1. Quantificação de aminoácidos em meio de cultura de UACC-62 e SK-MEL-29 e de glicose, piruvato e lactato em linhagens de melanoma humano.

Esta parte do trabalho visa avaliar os efeitos metabólicos de 1-MT e IFN- γ , não no metabolismo de triptofano, mas ampliar a visão metabólica da resposta a esses agentes. Já que o metabolismo dos aminoácidos é interligado, procuramos avaliar os efeitos de IFN- γ e 1-MT no metabolismo de Trp na concentração de outros aminoácidos no meio de cultura das células tumorais.

Esses experimentos foram realizados por derivatização dos aminoácidos com cloroformato de propila e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas, de acordo com a metodologia publicada por (Kaspar *et al.*, 2008) e os resultados podem ser observados na Figura 38 e 39, abaixo. Foram selecionadas duas linhagens, uma responsiva a IFN- γ (UACC-62), que produziu altas concentrações de KYN nesse tratamento e uma linhagem não responsiva (SK-MEL-29).

Ao avaliarmos os aminoácidos, pudemos observar que, em geral, IFN-γ foi capaz de aumentar levemente a concentração de alguns aminoácidos no meio de cultura,

efeito mais pronunciado em SK-MEL-29 (Figura 39). O mesmo efeito foi observado de forma ainda mais branda quando 1-MT fora adicionado às células UACC-62, e não foi reconhecido em SK-MEL-29. Em resposta mais pronunciada em ambas as células observamos os aminoácidos serina, valina, treonina e ácido glutâmico.



Aminoácidos em Meio de Cultura de Melanoma UACC-62

Figura 38: Efeito de IFN- γ e 1-MT sob a concentração dos aminoácidos em meio de cultura de UACC-62.



Aminoácidos em Meio de Cultura de Melanoma SK-MEL-29

Figura 39: Efeito de IFN- γ e 1-MT sob a concentração dos aminoácidos em meio de cultura de SK-MEL-29.

Em outro experimento realizado em colaboração com a Dra. Katja Dettmer-Wilde, avaliamos a concentração de glicose, piruvato e lactato nos melanomas do estudo. Devido a uma recente publicação que apresenta IDO como responsável por diminuir a captação de glicose e a glicólise aeróbia (Efeito Warburg) e aumentar a função mitocondrial e a síntese de IL-10 (Eleftheriadis *et al.*, 2012) em linfócitos estimulados, nos interessamos por saber o efeito de 1-MT e IFN- γ na captação de glicose, no produto da glicólise, o piruvato e no produto da glicólise aeróbia, lactato, nos melanomas humanos do estudo.

A metodologia utilizada baseou-se em um processo de derivatização e a análise foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas conforme publicado por (Dietl *et al.*, 2010) e os resultados são apresentados nas Tabelas 5 e 6. Na tabela 5 podemos observar o consumo basal de glicose pelos melanomas e a formação de lactato e piruvato. Os melanomas do estudo consomem altas concentrações de glicose, com exceção da célula WM-1366, que provavelmente por consumir menos glicose, produz as menores concentrações de lactato.

Melanoma	Glicose (µM)	Lactato (µM)	Piruvato (µM)
SK-Mel-29	0,268 ± 0,079	15,16 ± 0,65	0,047 ± 0,001
UACC-62	0,283 ± 0,037	16,14 ± 0,80	0,118 ± 0,009
SK-Mel-147	0,965 ± 0,153	13,71 ± 0,20	0.0621 ± 0,003
SK-Mel-19	0,557 ± 0,154	15,27 ± 1,44	0,0301 ± 0,005
WM-1366	4,842 ± 0,894	6,26 ± 1,88	0,0729 ± 0,010
RPMI – Meio	7,371 ± 0,59	0,833 ± 0,058	0

Tabela 5: Concentração de glicose, lactato e piruvato em cultura de melanomas.

Tabela 6: Concentração de glicose, lactato e piruvato em cultura de melanomas tratados com IFN- γ .

Melanoma	Glicose (µM)	Lactato (µM)	Piruvato (µM)
SK-Mel-29	4,84 ± 0,86	7,37 ± 2,01	0,09 ± 0,01
UACC-62	1,73 ± 0,2	13,08 ± 0,92	0,09 ± 0,01
SK-Mel-147	1,80 ± 0,38	13,76 ± 0,16	0,09 ± 0,01
SK-Mel-19	4,20 ± 0,63	8,86 ± 2,52	0,05 ± 0,01
WM-1366	6,24 ± 0,41	3,83 ± 0,73	0,05 ± 0,01

Na cultura dos melanomas foi utilizado o meio de cultura RPMI que contém altas concentrações de glicose (2 g/L). Na maioria das células pode-se observar que a presença de IFN- γ foi capaz de inibir a captação de glicose e modular a formação de seus metabólitos em melanomas (Tabela 6). O piruvato apresenta-se em maior concentração nos grupos IFN- γ nos melanomas SK-MEL-19, 29 e 147. Na quantificação de lactato, a adição de IFN-γ foi capaz de diminuir sua formação em todas as células, com exceção de SK-MEL-147.

Em todos os tumores do estudo podemos observar o conhecido Efeito Warburg (Warburg, Wind e Negelein, 1927) em que as células tumorais possuem elevadas taxas de glicólise seguida de formação de lactato mesmo na presença de oxigênio, efeito que também ficou conhecido como glicólise aeróbia. Além desse alto consumo de glicose e formação de lactato, vale ressaltar que esse último tem sido largamente estudado como promotor tumoral (facilitando o processo de metástase) e imunomodulador (impedindo a proliferação e diferenciação de monócitos) (Gottfried, Kreutz e Mackensen, 2012).

A glicose pode ser utilizada pela via glicolítica e sintetizar piruvato e, em tumores, lactato, mas também pode ser direcionada a sintetizar serina e glicina, por ação da fosfoglicerato desidrogenase, alterada em alguns tumores, como nos melanomas (Deberardinis, 2011; Locasale *et al.*, 2011). Em Melanoma SK-MEL-28 foi descrito um alto influxo de glicose não para piruvato, mas sim para síntese de serina e glicina (Locasale e Cantley, 2011; Locasale *et al.*, 2011). Em nosso estudo podemos observar um aumento significativo de serina no meio de cultura na presença de IFN-γ em ambos os melanomas, porém não há descrição da capacidade de IFN-γ estimular essa via.

Embora IFN- γ diminua a captação de glicose por essas células (principalmente em SK-MEL-29), e aumente a concentração de serina no meio, observa-se um efeito oposto com relação a piruvato, em que IFN- γ aumenta as concentrações de piruvato em meio de cultura de SK-MEL-29 e diminui em UACC-62. Com relação ao lactato, a presença de IFN- γ diminuiu as concentrações no meio de cultura em todas as células – com exceção de SK-MEL-147, que se manteve inalterada.

7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, J.; HAARMANN-STEMMANN, T. An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. **Biol Chem,** v. 391, n. 11, p. 1235-48, Nov 2010. ISSN 1437-4315. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20868221</u> >.

ADAMS, S. et al. The Kynurenine Pathway in Brain Tumor Pathogenesis. **Cancer Research**, v. 72, n. 22, p. 5649-5657, Nov 15 2012. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000311141300001 >.

AGAUGUE, S. et al. 1-methyl-tryptophan can interfere with TLR signaling in dendritic cells independently of IDO activity. **Journal of Immunology,** v. 177, n. 4, p. 2061-2071, Aug 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000239745300011 >.

AHERN, G. P. 5-HT and the immune system. **Current Opinion in Pharmacology,** v. 11, n. 1, p. 29-33, Feb 2011. ISSN 1471-4892. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000289698700005 >.

BALASURIYA, D. et al. The Sigma-1 Receptor Binds to the Nav1.5 Voltage-gated Na+ Channel with 4-Fold Symmetry. **Journal of Biological Chemistry,** v. 287, n. 44, p. 37021-37029, Oct 2012. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000310588500037 >.

BALCH, C. M. et al. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. **Journal of Clinical Oncology,** v. 27, n. 36, p. 6199-6206, Dec 2009. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000272867500020 >.

BALL, H. J. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology,** v. 41, n. 3, p. 467-471, Mar 2009. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263195800006 >.

BARTH, M. C. et al. Kynurenic Acid Triggers Firm Arrest of Leukocytes to Vascular Endothelium under Flow Conditions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 29, p. 19189-19195, Jul 17 2009. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000267908300008 >.

BARTSCH, C.; BARTSCH, H.; KARASEK, M. Melatonin in clinical oncology. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 23 Suppl 1, p. 30-8, Apr 2002. ISSN 0172-780X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li</u>st_uids=12019349 >.

BAUER, T. M. et al. Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses in vitro and in vivo. **Transplant International,** v. 18, n. 1, p. 95-100, Jan 2005. ISSN 0934-0874. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226927800014 >.

BERMUDEZ, Y. et al. Nicotinic Acid Receptor Abnormalities in Human Skin Cancer: Implications for a Role in Epidermal Differentiation. **Plos One,** v. 6, n. 5, May 31 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000291097600077 >.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature Immunology,** v. 11, n. 10, p. 889-896, Oct 2010. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281926900007 >.

_____. Orchestration of Metabolism by Macrophages. **Cell Metabolism,** v. 15, n. 4, p. 432-437, Apr 4 2012. ISSN 1550-4131. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000302523400006 >.

BOSCO, M. C. et al. Macrophage activating properties of the tryptophan catabolite picolinic acid. **Developments in Tryptophan and Serotonin Metabolism,** v. 527, p. 55-65, 2003 2003. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000189415400006 >.

BOYLAND, E.; WILLIAMS, D. C. METABOLISM OF TRYPTOPHAN .2. METABOLISM OF TRYPTOPHAN IN PATIENTS SUFFERING FROM CANCER OF THE BLADDER. **Biochemical Journal**, v. 64, n. 3, p. 578-582, 1956 1956. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1956WA24100035 >.

BRADY, F. O.; FEIGELSON, P. Photoactivation of pseudomonad L-tryptophan oxygenase by electron ejection from its substrate, L-tryptophan. **Arch Biochem Biophys,** v. 156, n. 2, p. 745-50, Jun 1973. ISSN 0003-9861. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4718791 >.

BRANDNER, J. M.; HAASS, N. K. Melanoma's connections to the tumour microenvironment. **Pathology,** v. 45, n. 5, p. 443-452, Aug 2013. ISSN 0031-3025. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000326752800001 >.

BRAUN, D.; LONGMAN, R. S.; ALBERT, M. L. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. **Blood**, v. 106, n. 7, p. 2375-2381, Oct 2005. ISSN 0006-4971. Disponível em: < Go to ISI>://WOS:000232134700032 >.

BRIEND, G. et al. Role of Kynurenine pathway in the polarization of human lung macrophages. **Fundamental & Clinical Pharmacology,** v. 28, p. 35-35, May 2014. ISSN 0767-3981. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000337041300155 >.

BRUSKO, T. M. et al. An integral role for heme oxygenase-1 and carbon monoxide in maintaining peripheral tolerance by CD4+CD25+ regulatory T cells. **J Immunol**, v. 174, n. 9, p. 5181-6, May 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15843512 >.

CANTOR, J. R.; SABATINI, D. M. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. **Cancer Discov**, v. 2, n. 10, p. 881-98, Oct 2012. ISSN 2159-8290. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23009760</u> >.

CARRILLO-VICO, A. et al. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. **Faseb Journal**, v. 18, n. 1, p. 537-+, Jan 2004. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000188829300026 >.

CHERAYIL, B. Indoleamine 2,3-dioxygenase in intestinal immunity and inflammation. Inflamm Bowel Dis, v. 15, n. 9, p. 1391-6, Sep 2009. ISSN 1536-4844. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li st_uids=19322906 >.

CHEVOLET, I. et al. Peritumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression in melanoma: an early marker of resistance to immune control? **Br J Dermatol**, May 2014. ISSN 1365-2133. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24814041</u> >.

CHIARUGI, A. et al. Synthesis and release of neurotoxic kynurenine metabolites by human monocyte-derived macrophages. **Journal of Neuroimmunology,** v. 120, n. 1-2, p. 190-198, Nov 2001. ISSN 0165-5728. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000172224100022 >.

_____. The NAD metabolome - a key determinant of cancer cell biology. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 11, p. 741-752, Nov 2012. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000310433900011 >.

_____. Tryptophan availability selectively limits NO-synthase induction in macrophages. Journal of Leukocyte Biology, v. 73, n. 1, p. 172-177, Jan 2003. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180460900018 >.

CHRISTEN, S.; PETERHANS, E.; STOCKER, R. ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF SOME TRYPTOPHAN-METABOLITES - POSSIBLE IMPLICATION FOR INFLAMMATORY DISEASES. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 87, n. 7, p. 2506-2510, Apr 1990. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1990CX49700026 >.

CHUNG, K.-T.; GADUPUDI, G. S. Possible Roles of Excess Tryptophan Metabolites in Cancer. **Environmental and Molecular Mutagenesis,** v. 52, n. 2, p. 81-104, Mar 2011. ISSN 0893-6692. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000287158600001 >.

DALLEGRI, F. et al. PHA-INDUCED NEUTROPHIL-MEDIATED CYTO-TOXICITY. **Journal of Clinical & Laboratory Immunology,** v. 11, n. 4, p. 203-206, 1983 1983. ISSN 0141-2760. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1983RC23100007 >.

DARAKHSHAN, S.; POUR, A. B. Tranilast: A review of its therapeutic applications. **Pharmacol Res**, v. 91C, p. 15-28, Nov 2014. ISSN 1096-1186. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25447595</u> >.

DE JONG, R. A. et al. Serum Tryptophan and Kynurenine Concentrations as Parameters for Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity in Patients With Endometrial, Ovarian, and Vulvar Cancer. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 21, n. 7, p. 1320-1327, Oct 2011. ISSN 1048-891X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000295161200023 >.

DE RAVIN, S. S. et al. Tryptophan/kynurenine metabolism in human leukocytes is independent of superoxide and is fully maintained in chronic granulomatous disease. **Blood**, v. 116, n. 10, p. 1755-1760, Sep 9 2010. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281757400020 >.

DEBERARDINIS, R. J. Serine Metabolism: Some Tumors Take the Road Less Traveled. **Cell Metabolism,** v. 14, n. 3, p. 285-286, Sep 7 2011. ISSN 1550-4131. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000295660200003 >.

DETTMER, K. et al. Metabolite extraction from adherently growing mammalian cells for metabolomics studies: optimization of harvesting and extraction protocols. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 3, p. 1127-1139, Jan 2011. ISSN 1618-2642. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000286599100013 >.

_____. Distinct metabolic differences between various human cancer and primary cells. **Electrophoresis,** v. 34, n. 19, p. 2836-2847, Oct 2013. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000327667800008 >.

DIETL, K. et al. Lactic Acid and Acidification Inhibit TNF Secretion and Glycolysis of Human Monocytes. **Journal of Immunology,** v. 184, n. 3, p. 1200-1209, Feb 1 2010. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273956400011 >.

DINATALE, B. C. et al. Kynurenic Acid Is a Potent Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand that Synergistically Induces Interleukin-6 in the Presence of Inflammatory Signaling. **Toxicological Sciences,** v. 115, n. 1, p. 89-97, May 2010. ISSN 1096-6080. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000276742200009 >.

DIVITO, S. J.; FERRIS, L. K. Advances and short comings in the early diagnosis of melanoma. **Melanoma Research,** v. 20, n. 6, p. 450-458, Dec 2010. ISSN 0960-8931. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000283744100003 >.

DUNN, G. P.; KOEBEL, C. M.; SCHREIBER, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 11, p. 836-848, Nov 2006. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241574000014 >.

EBANKS, J. P.; WICKETT, R. R.; BOISSY, R. E. Mechanisms regulating skin pigmentation: the rise and fall of complexion coloration. **Int J Mol Sci**, v. 10, n. 9, p. 4066-87, Sep 2009. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19865532</u> >.

EGGERMONT, A. M. M.; SPATZ, A.; ROBERT, C. Cutaneous melanoma. **Lancet**, v. 383, n. 9919, p. 816-827, Mar 2014. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000332398700029 >.

ELEFTHERIADIS, T. et al. The Indoleamine 2,3-dioxygenase Inhibitor 1-methyl-tryptophan Suppresses Mitochondrial Function, Induces Aerobic Glycolysis and Decreases Interleukin-10 Production in Human Lymphocytes. **Immunological Investigations,** v. 41, n. 5, p. 507-520, 2012 2012. ISSN 0882-0139. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000304881800006 >.

ELLIS, T. N.; BEAMAN, B. L. Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function. **Immunology,** v. 112, n. 1, p. 2-12, May 2004. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000220886200001 >.

ELMETS, C. A.; ATHAR, M. Milestones in photocarcinogenesis. J Invest Dermatol, v. 133, n. E1, p. E13-7, Jun 2013. ISSN 1523-1747. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23820719 >.

ERDAG, G. et al. Immunotype and Immunohistologic Characteristics of Tumor-Infiltrating Immune Cells Are Associated with Clinical Outcome in Metastatic Melanoma. **Cancer Research**, v. 72, n. 5, p. 1070-1080, Mar 1 2012. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000300989100007 >.

FAIRWEATHER, D.; CIHAKOVA, D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. **Journal of Autoimmunity,** v. 33, n. 3-4, p. 222-230, Nov-Dec 2009. ISSN 0896-8411. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000272896800009 >.

FINOCCHIARO, L. M. E. et al. SEROTONIN AND MELATONIN SYNTHESIS IN PERIPHERAL-BLOOD MONONUCLEAR-CELLS - STIMULATION BY INTERFERON-GAMMA AS PART OF AN IMMUNOMODULATORY PATHWAY. **Journal of Interferon Research**, v. 8, n. 6, p. 705-716, Dec 1988. ISSN 0197-8357. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1988R844800002 >.

FISCHER, T. W. et al. Melatonin suppresses reactive oxygen species in UV-irradiated leukocytes more than vitamin C and trolox. **Skin Pharmacol Appl Skin Physiol**, v. 15, n. 5, p. 367-73, 2002 Sep-Oct 2002. ISSN 1422-2868. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12239433 >.

_____. Melatonin as a major skin protectant: from free radical scavenging to DNA damage repair. **Experimental Dermatology,** v. 17, n. 9, p. 713-730, Sep 2008. ISSN 0906-6705. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258256400001 >.

FONTANILLA, D. et al. The hallucinogen N,N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator. **Science**, v. 323, n. 5916, p. 934-7, Feb 2009. ISSN 1095-9203. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li st_uids=19213917 >.

FOSTER, A. C. et al. KYNURENIC ACID BLOCKS NEUROTOXICITY AND SEIZURES INDUCED IN RATS BY THE RELATED BRAIN METABOLITE QUINOLINIC ACID. **Neuroscience Letters,** v. 48, n. 3, p. 273-278, 1984 1984. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1984TG18800005 >.

FOTOPOULOU, C. et al. Systemic Changes of Tryptophan Catabolites via the Indoleamine-2,3dioxygenase Pathway in Primary Cervical Cancer. **Anticancer Research**, v. 31, n. 8, p. 2629-2635, Aug 2011. ISSN 0250-7005. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000293044200011 >.

FRAIKIN, G. Y. et al. Near-UV activation of enzymatic conversion of 5-hydroxytryptophan to serotonin. **Photochem Photobiol,** v. 49, n. 4, p. 475-7, Apr 1989. ISSN 0031-8655. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2786220</u> >.

FRASIER, C. R. et al. Redox-dependent increases in glutathione reductase and exercise preconditioning: role of NADPH oxidase and mitochondria. **Cardiovasc Res,** v. 98, n. 1, p. 47-55, Apr 2013. ISSN 1755-3245. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23341578 >.

FREIRE-GARABAL, M. et al. Serotonin upregulates the activity of phagocytosis through 5-HT1A receptors. **British Journal of Pharmacology,** v. 139, n. 2, p. 457-463, May 2003. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000183298400030 >.

FRUMENTO, G. et al. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. **Journal of Experimental Medicine,** v. 196, n. 4, p. 459-468, Aug 19 2002. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000177669300005 >.

GAJEWSKI, T. F.; SCHREIBER, H.; FU, Y.-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. **Nature Immunology,** v. 14, n. 10, p. 1014-1022, Oct 2013. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000324584700006 >.

GOBAILLE, S. et al. Xanthurenic acid distribution, transport, accumulation and release in the rat brain. **J Neurochem**, v. 105, n. 3, p. 982-93, May 2008. ISSN 1471-4159. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18182052 >.

GOGOLAK, P. et al. Differentiation of CD1a(-) and CD1a(+) monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPAR gamma. **Blood**, v. 109, n. 2, p. 643-652, Jan 15 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243416600043 >.

GOMES, M. M. et al. Biosynthesis of N,N-dimethyltryptamine (DMT) in a melanoma cell line and its metabolization by peroxidases. **Biochemical Pharmacology**, v. 88, n. 3, p. 393-401, APR 1 2014 2014. ISSN 0006-2952;1873-2968.

GOTTFRIED, E.; KREUTZ, M.; MACKENSEN, A. Tumor metabolism as modulator of immune response and tumor progression. **Seminars in Cancer Biology,** v. 22, n. 4, p. 335-341, Aug 2012. ISSN 1044-579X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000306725300009 >.

GRAMATZKI, D. et al. Aryl hydrocarbon receptor inhibition downregulates the TGF-beta/Smad pathway in human glioblastoma cells. **Oncogene,** v. 28, n. 28, p. 2593-2605, Jul 16 2009. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268058900005 >.

GUERMONPREZ, P. et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annual Review of Immunology,** v. 20, p. 621-667, 2002 2002. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000175012600021 >.

GUILLEMIN, G. J. et al. Characterization of the kynurenine pathway in human neurons. **Journal** of Neuroscience, v. 27, n. 47, p. 12884-12892, Nov 21 2007. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000251157200016 >.

GUNZER, M. et al. Migration of dendritic cells within 3-D collagen lattices is dependent on tissue origin, state of maturation, and matrix structure and is maintained by proinflammatory cytokines. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 67, n. 5, p. 622-629, May 2000. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000087965200005 >.

HAINZ, U. et al. Monocyte-mediated T-cell suppression and augmented monocyte tryptophan catabolism after human hematopoietic stem-cell transplantation. **Blood**, v. 105, n. 10, p. 4127-4134, May 15 2005. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000229009000061 >.

HAN, E. H. et al. CCAAT/ enhancer-binding protein β activation by capsaicin contributes to the regulation of CYP1A1 expression, mediated by the aryl hydrocarbon receptor. **Br J Pharmacol**, v. 164, n. 6, p. 1600-13, Nov 2011. ISSN 1476-5381. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21250977</u> >.

HARUMI, T.; MATSUSHIMA, S. Separation and assay methods for melatonin and its precursors. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, v. 747, n. 1-2, p. 95-110, Sep 2000. ISSN 1387-2273. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li</u> st uids=11103901 >.

HEATH-PAGLIUSO, S. et al. Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. **Biochemistry,** v. 37, n. 33, p. 11508-11515, Aug 18 1998. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000075516100014 >.

HEYES, M. P. et al. Human microglia convert L-tryptophan into the neurotoxin quinolinic acid. **Biochemical Journal,** v. 320, p. 595-597, Dec 1996. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996VX98900034 >.

HEYES, M. P.; SAITO, K.; MARKEY, S. P. HUMAN MACROPHAGES CONVERT L-TRYPTOPHAN INTO THE NEUROTOXIN QUINOLINIC ACID. **Biochemical Journal**, v. 283, p. 633-635, May 1992. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1992HR72000002 >.

HIRATA, F. et al. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. **J Biol Chem,** v. 249, n. 4, p. 1311-3, Feb 1974. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li</u> <u>st_uids=4814344</u> >.

HOOGDUIJN, M. J. et al. Glutamate receptors on human melanocytes regulate the expression of MiTF. **Pigment Cell Research**, v. 19, n. 1, p. 58-67, Feb 2006. ISSN 0893-5785. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234696700006 >.

HOU, D.-Y. et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. **Cancer Research**, v. 67, n. 2, p. 792-801, Jan 15 2007. ISSN 0008-5472. Disponível em: < Go to ISI>://WOS:000243683000045 >.

HWU, P. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. **Journal of Immunology,** v. 164, n. 7, p. 3596-3599, Apr 1 2000. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000086020700021 >.

INO, K. et al. Inverse correlation between tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with disease progression and survival. **Clin Cancer Res,** v. 14, n. 8, p. 2310-7, Apr 2008. ISSN 1078-0432. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li st_uids=18413819 >.

IYENGAR, B. Photomodulation of the melanocyte cell cycle by indoleamines. **Biological Signals** and **Receptors,** v. 7, n. 6, p. 345-350, Nov-Dec 1998. ISSN 1422-4933. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000077793500005 >.

JACKSON, J. C. et al. SPECIFIC UPTAKE OF SEROTONIN BY MURINE MACROPHAGES. Life Sciences, v. 42, n. 17, p. 1641-1650, 1988 1988. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1988M655600009 >.

JACOB, M. S.; PRESTI, D. E. Endogenous psychoactive tryptamines reconsidered: an anxiolytic role for dimethyltryptamine. **Medical Hypotheses**, v. 64, n. 5, p. 930-937, 2005 2005. ISSN 0306-9877. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000228107500007 >.

JUHASZ, C. et al. Tryptophan metabolism in breast cancers: molecular imaging and immunohistochemistry studies. **Nuclear Medicine and Biology,** v. 39, n. 7, p. 926-932, Oct 2012. ISSN 0969-8051. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000309033800006 >.

KANTH, V. R.; LAVANYA, K.; SRINIVAS, J. Elevated Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) and Accumulation of Kynurenic Acid in the Pathogenesis of STZ-Induced Diabetic Cataract in Wistar Rats. **Current Eye Research**, v. 34, n. 4, p. 274-281, 2009 2009. ISSN 0271-3683. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000265292500004 >.

KASPAR, H. et al. Automated GC-MS analysis of free amino acids in biological fluids. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences,** v. 870, n. 2, p. 222-232, Jul 15 2008. ISSN 1570-0232. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258388600014 >.

KESZTHELYI, D.; TROOST, F.; MASCLEE, A. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. **Neurogastroenterol Motil,** v. 21, n. 12, p. 1239-49, Dec 2009. ISSN 1365-2982. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li st_uids=19650771 >.

KESZTHELYI, D.; TROOST, F. J.; MASCLEE, A. A. M. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. **Neurogastroenterology and Motility,** v. 21, n. 12, p. 1239-1249, Dec 2009. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000271644200002 >.

KIANK, C. et al. Psychological Stress-Induced, IDO1-Dependent Tryptophan Catabolism: Implications on Immunosuppression in Mice and Humans. **Plos One,** v. 5, n. 7, Jul 28 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000280520100009 >.

KIM, R.; EMI, M.; TANABE, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. **Immunology**, v. 121, n. 1, p. 1-14, May 2007. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000245399800001 >.

KING, N. J. C.; THOMAS, S. R. Molecules in focus: Indoleamine 2,3-dioxygenase. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 39, n. 12, p. 2167-2172, 2007 2007. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000250899300003 >.

KOBAYASHI, H. et al. A role of melatonin in neuroectodermal-mesodermal interactions: the hair follicle synthesizes melatonin and expresses functional melatonin receptors. **FASEB J,** v. 19, n. 12, p. 1710-2, Oct 2005. ISSN 1530-6860. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16030176 >.

LABROUSSE, A. L. et al. Stromal reaction in cutaneous melanoma. **Critical Reviews in Oncology Hematology,** v. 49, n. 3, p. 269-275, Mar 2004. ISSN 1040-8428. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000220125000011 >.

LEPPANEN, V. V.; OKA, M. METABOLISM OF TRYPTOPHAN IN CANCER OF VARIOUS SITES. Annales Medicinae Experimentalis Et Biologiae Fenniae, v. 41, n. 2, p. 123-&, 1963 1963. ISSN 0003-4479. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A19634707A00011 >.

LERNER, A. et al. Melatonin in peripheral nerve. **Nature,** v. 183, p. 1821, Jun 1959. ISSN 0028-0836. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li st_uids=14415934 >.

LIMA, V. L. A. et al. The Antioxidant Role of Xanthurenic Acid in the Aedes aegypti Midgut during Digestion of a Blood Meal. **Plos One,** v. 7, n. 6, Jun 11 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000305337600020 >.

LISSONI, P. et al. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. **Neuro Endocrinol Lett,** v. 22, n. 1, p. 45-7, 2001. ISSN 0172-780X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li</u> <u>st_uids=11335879</u> >.

LOB, S. et al. IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. **Cancer Immunology Immunotherapy,** v. 58, n. 1, p. 153-157, Jan 2009. ISSN 0340-7004. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000260369800015 >.

LOCASALE, J. W.; CANTLEY, L. C. Genetic selection for enhanced serine metabolism in cancer development. **Cell Cycle**, v. 10, n. 22, p. 3812-3813, Nov 15 2011. ISSN 1538-4101. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000297168600006 >.

LOCASALE, J. W. et al. Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. **Nature Genetics**, v. 43, n. 9, p. 869-U79, Sep 2011. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000294325800013 >.

LOEB, S.; KOENIGSRAINER, A. Is IDO a key enzyme bridging the gap between tumor escape and tolerance induction? **Langenbecks Archives of Surgery,** v. 393, n. 6, p. 995-1003, Nov 2008. ISSN 1435-2443. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000259819300024 >.

LOEFFEK, S. et al. Melanoma cell-derived vascular endothelial growth factor induces endothelial tubulogenesis within fibrin gels by a metalloproteinase-mediated mechanism. **European Journal of Cell Biology,** v. 85, n. 11, p. 1167-1177, Nov 2006. ISSN 0171-9335. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000242088500004 >. LUECKE, S. et al. The aryl hydrocarbon receptor (AHR), a novel regulator of human melanogenesis. **Pigment Cell Melanoma Res,** v. 23, n. 6, p. 828-33, Dec 2010. ISSN 1755-148X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20973933</u> >.

MAILANKOT, M.; NAGARAJ, R. H. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by interferongamma in human lens epithelial cells: Apoptosis through the formation of 3hydroxykynurenine. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology,** v. 42, n. 9, p. 1446-1454, Sep 2010. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000280967700011 >.

MANDA, K.; UENO, M.; ANZAI, K. AFMK, a melatonin metabolite, attenuates X-ray-induced oxidative damage to DNA, proteins and lipids in mice. **J Pineal Res**, v. 42, n. 4, p. 386-93, Apr 2007. ISSN 0742-3098. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17439555</u> >.

MASSAGUE, J. TGF beta in cancer. **Cell,** v. 134, n. 2, p. 215-230, Jul 25 2008. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000257891700012 >.

MAVLYUTOV, T. A. et al. DEVELOPMENT OF THE SIGMA-1 RECEPTOR IN C-TERMINALS OF MOTONEURONS AND COLOCALIZATION WITH THE N,N '-DIMETHYLTRYPTAMINE FORMING ENZYME, INDOLE-N-METHYL TRANSFERASE. **Neuroscience**, v. 206, p. 60-68, Mar 29 2012. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000302202900007 >.

MAYO, J. C. et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and n1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. **Journal of Neuroimmunology**, v. 165, n. 1-2, p. 139-149, Aug 2005. ISSN 0165-5728. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000230995800015 >.

MCEWAN, M.; PARSONS, P. G. INHIBITION OF MELANIZATION IN HUMAN-MELANOMA CELLS BY A SEROTONIN UPTAKE INHIBITOR. **Journal of Investigative Dermatology,** v. 89, n. 1, p. 82-86, Jul 1987. ISSN 0022-202X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1987H878800017 >.

METZ, R. et al. IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. **Oncoimmunology**, v. 1, n. 9, p. 1460-1468, Dec 2012. ISSN 2162-4011. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000316281700002 >.

_____. IDO2 is critical for IDO1-mediated T-cell regulation and exerts a non-redundant function in inflammation. **International Immunology,** v. 26, n. 7, p. 357-367, Jul 2014. ISSN 0953-8178. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000339420800001 >.

MOFFETT, J. R.; NAMBOODIRI, M. A. Tryptophan and the immune response. **Immunology and Cell Biology,** v. 81, n. 4, p. 247-265, Aug 2003. ISSN 0818-9641. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000184042600002 >.

MORENO, A. C. et al. The expanding roles of 1-methyl-tryptophan (1-MT): in addition to inhibiting kynurenine production, 1-MT activates the synthesis of melatonin in skin cells. **FEBS**

J, v. 280, n. 19, p. 4782-92, Oct 2013. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23879623</u> >.

MOURAO, L. R. M. B. et al. Protective action of indole-3-acetic acid on induced hepatocarcinoma in mice. **Cell Biochemistry and Function,** v. 27, n. 1, p. 16-22, Jan 2009. ISSN 0263-6484. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000262617400004 >.

MULLER, A.; SCHERLE, P. Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with smallmolecule inhibitors. **Nat Rev Cancer,** v. 6, n. 8, p. 613-25, Aug 2006. ISSN 1474-175X. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li st_uids=16862192 >.

MULLER, A. J. et al. Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune suppression by inducing indoleamine 2,3 dioxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 105, n. 44, p. 17073-17078, Nov 4 2008. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000260913800051 >.

MUNN, D.; MELLOR, A. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. J Clin Invest, v. 117, n. 5, p. 1147-54, May 2007. ISSN 0021-9738. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17476344 >.

MUNN, D. et al. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. **J Exp Med**, v. 189, n. 9, p. 1363-72, May 1999. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li</u> <u>st_uids=10224276</u> >.

NATARAJAN, V. T. et al. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. **Nature Chemical Biology,** v. 10, n. 7, p. 542-551, Jul 2014. ISSN 1552-4450; 1552-4469. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000337871200011 >.

______. IFN-γ signaling maintains skin pigmentation homeostasis through regulation of melanosome maturation. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 111, n. 6, p. 2301-6, Feb 2014. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24474804</u> >.

_____. Transcriptional upregulation of Nrf2-dependent phase II detoxification genes in the involved epidermis of vitiligo vulgaris. **J Invest Dermatol,** v. 130, n. 12, p. 2781-9, Dec 2010. ISSN 1523-1747. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20664557</u> >.

NGUYEN, N. T. et al. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 107, n. 46, p. 19961-19966, Nov 2010. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000284261800066 >.

NORDLIND, K.; AZMITIA, E.; SLOMINSKI, A. The skin as a mirror of the soul: exploring the possible roles of serotonin. **Exp Dermatol,** v. 17, n. 4, p. 301-11, Apr 2008. ISSN 1600-0625. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li st_uids=18177349 >.

NTAYI, C. et al. Elastin-derived peptides upregulate matrix metalloproteinase-2-ediated melanoma cell invasion through elastin-binding protein. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, n. 2, p. 256-265, Feb 2004. ISSN 0022-202X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000188991100019 >.

NURCOMBE, H. L.; BUCKNALL, R. C.; EDWARDS, S. W. NEUTROPHILS ISOLATED FROM THE SYNOVIAL-FLUID OF PATIENTS WITH RHEUMATOID-ARTHRITIS - PRIMING AND ACTIVATION INVIVO. **Annals of the Rheumatic Diseases,** v. 50, n. 3, p. 147-153, Mar 1991. ISSN 0003-4967. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1991EZ75700003 >.

O'CONNELL, P. J. et al. A novel form of immune signaling revealed by transmission of the inflammatory mediator serotonin between dendritic cells and T cells. **Blood,** v. 107, n. 3, p. 1010-1017, Feb 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234991600034 >.

OLIVEIRA, B. L. et al. Human monocytes but not dendritic cells are killed by blocking of autocrine cyclooxygenase activity. **Cellular Immunology**, v. 258, n. 1, p. 107-114, 2009 2009. ISSN 0008-8749. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000266449100014 >.

OPITZ, C. et al. Tryptophan degradation in autoimmune diseases. **Cell Mol Life Sci**, v. 64, n. 19-20, p. 2542-63, Oct 2007. ISSN 1420-682X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17611712 >.

OPITZ, C. A. et al. The Indoleamine-2,3-Dioxygenase (IDO) Inhibitor 1-Methyl-D-tryptophan Upregulates IDO1 in Human Cancer Cells. **Plos One,** v. 6, n. 5, May 20 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000290793400013 >.

_____. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. **Nature,** v. 478, n. 7368, p. 197-203, Oct 2011. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21976023</u> >.

ORTWERTH, B. J.; BHATTACHARYYA, J.; SHIPOVA, E. Tryptophan Metabolites from Young Human Lenses and the Photooxidation of Ascorbic Acid by UVA Light. **Investigative Ophthalmology & Visual Science,** v. 50, n. 7, p. 3311-3319, Jul 2009. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000267292100036 >.

OZAKI, Y.; EDELSTEIN, M. P.; DUCH, D. S. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon gamma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 4, p. 1242-6, Feb 1988. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3124115 >.

PALLOTTA, M. T. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. **Nature Immunology**, v. 12, n. 9, p. 870-U91, Sep 2011. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000294461200011 >.

PETERS, J. C. TRYPTOPHAN NUTRITION AND METABOLISM - AN OVERVIEW. **Kynurenine and Serotonin Pathways : Progress in Tryptophan Research,** v. 294, p. 345-358, 1991 1991. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1991BU28Z00032 >.

PILOTTE, L. et al. Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3dioxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 109, n. 7, p. 2497-2502, Feb 14 2012. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000300489200068 >.

PINHO, M. P. et al. Dendritic cell membrane CD83 enhances immune responses by boosting intracellular calcium release in T lymphocytes. **Journal of Leukocyte Biology,** v. 95, n. 5, p. 755-762, May 2014. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000335340900008 >.

PLATTEN, M.; WICK, W.; VAN DEN EYNDE, B. J. Tryptophan Catabolism in Cancer: Beyond IDO and Tryptophan Depletion. **Cancer Research,** v. 72, n. 21, p. 5435-5440, Nov 1 2012. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000310582000001 >.

POORMASJEDI-MEIBOD, M. S. et al. Anti-scarring properties of different tryptophan derivatives. **PLoS One,** v. 9, n. 3, p. e91955, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24637853</u> >.

RAMOS, R. N. et al. Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 3, p. 673-682, Sep 2012. ISSN 0741-5400. Disponível em: < Go to ISI>://WOS:000308391100027 >.

RAVINDRA, T.; LAKSHMI, N.; AHUJA, Y. Melatonin in pathogenesis and therapy of cancer. **Indian J Med Sci**, v. 60, n. 12, p. 523-35, Dec 2006. ISSN 0019-5359. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li</u> <u>st_uids=17130668</u> >.

REY-GIRAUD, F.; HAFNER, M.; RIES, C. H. In Vitro Generation of Monocyte-Derived Macrophages under Serum-Free Conditions Improves Their Tumor Promoting Functions. **Plos One,** v. 7, n. 8, Aug 6 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000307810000057 >. RIBA, J. et al. Psychometric assessment of the Hallucinogen Rating Scale. **Drug Alcohol Depend,** v. 62, n. 3, p. 215-23, May 2001. ISSN 0376-8716. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li</u> <u>st_uids=11295326</u> >.

ROBINSON, C. M.; HALE, P. T.; CARLIN, J. M. The role of IFN-gamma and TNF-alpha-responsive regulatory elements in the synergistic induction of indoleamine dioxygenase. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 25, n. 1, p. 20-30, Jan 2005. ISSN 1079-9907. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226366600003 >.

RODRIGUES, M. R. et al. Interferon-gamma independent oxidation of melatonin by macrophages. **Journal of Pineal Research**, v. 34, n. 1, p. 69-74, Jan 2003. ISSN 0742-3098. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000179910500010 >.

RUITER, D. et al. Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. Lancet **Oncology**, v. 3, n. 1, p. 35-43, Jan 2002. ISSN 1470-2045. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000174781500021 >.

SAGAN, D. et al. Serum kynurenic acid: possible association with invasiveness of non-small cell lung cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 13, n. 9, p. 4241-4, 2012. ISSN 1513-7368. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23167321</u> >.

SAHM, F. et al. The Endogenous Tryptophan Metabolite and NAD(+) Precursor Quinolinic Acid Confers Resistance of Gliomas to Oxidative Stress. **Cancer Research**, v. 73, n. 11, p. 3225-3234, Jun 1 2013. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000319736800005 >.

SAINZ, R. et al. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. **Cell Mol Life Sci,** v. 60, n. 7, p. 1407-26, Jul 2003. ISSN 1420-682X. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li st_uids=12943228 >.

SCHMIDT, S. K. et al. Influence of Tryptophan Contained in 1-Methyl-Tryptophan on Antimicrobial and Immunoregulatory Functions of Indoleamine 2,3-Dioxygenase. **Plos One,** v. 7, n. 9, Sep 13 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000308788700041 >.

SCHROCKSNADEL, K. et al. Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. **Clinica Chimica Acta,** v. 364, n. 1-2, p. 82-90, Feb 2006. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000235376800008 >.

SHAH, G. M. et al. Biochemical assessment of niacin deficiency among carcinoid cancer patients. **American Journal of Gastroenterology,** v. 100, n. 10, p. 2307-2314, Oct 2005. ISSN 0002-9270. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000231950500027 >.

SHALABY, M. R. et al. ACTIVATION OF HUMAN POLYMORPHONUCLEAR NEUTROPHIL FUNCTIONS BY INTERFERON-GAMMA AND TUMOR NECROSIS FACTORS. **Journal of Immunology**, v. 135, n. 3, p. 2069-2073, 1985 1985. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1985ANX4100081 >.

SILVA, S. et al. Oxidation of melatonin and its catabolites, N1-acetyl-N2 -formyl-5methoxykynuramine and N1-acetyl-5-methoxykynuramine, by activated leukocytes. J Pineal Res, v. 37, n. 3, p. 171-5, Oct 2004. ISSN 0742-3098. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li</u> st_uids=15357661 >.

_____. Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release. J Neuroimmunol, v. 156, n. 1-2, p. 146-52, Nov 2004. ISSN 0165-5728. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li st_uids=15465605 >.

_____. Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of melatonin by activated neutrophils. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 279, n. 2, p. 657-62, Dec 2000. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li</u> <u>st_uids=11118341</u> >.

______. High concentrations of the melatonin metabolite, N1-acetyl-N2-formyl-5methoxykynuramine, in cerebrospinal fluid of patients with meningitis: a possible immunomodulatory mechanism. **J Pineal Res,** v. 39, n. 3, p. 302-6, Oct 2005. ISSN 0742-3098. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li st_uids=16150112 >.

SILVA, S. O. et al. Melatonin and its kynurenin-like oxidation products affect the microbicidal activity of neutrophils. **Microbes and Infection,** v. 8, n. 2, p. 420-425, Feb 2006. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000235790200015 >.

_____. Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release. **Journal of Neuroimmunology,** v. 156, n. 1-2, p. 146-152, Nov 2004. ISSN 0165-5728. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000224669800016 >.

SINDRILARU, A. et al. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 3, p. 985-997, Mar 2011. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000287991000019 >.

SLOMINSKI, A. et al. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 137-48, Jul 2005. ISSN 1355-008X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16217127 >.

_____. Serotoninergic and melatoninergic systems are fully expressed in human skin. **Faseb Journal**, v. 16, n. 6, p. 896-+, Apr 2002. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000175425900024 >.

_____. Functional activity of serotoninergic and melatoninergic systems expressed in the skin. J **Cell Physiol**, v. 196, n. 1, p. 144-53, Jul 2003. ISSN 0021-9541. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12767050</u> >.

SLOMINSKI, A.; WORTSMAN, J.; TOBIN, D. J. The cutaneous serotoninergic/melatoninergic system: securing a place under the sun. **FASEB J,** v. 19, n. 2, p. 176-94, Feb 2005. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15677341</u> >.

SLOMINSKI, A. T. et al. Local Melatoninergic System as the Protector of Skin Integrity. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 10, p. 17705-17732, 2014. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25272227</u> >.

SMITH, W.; FELDMANN, M.; LONDEI, M. Human macrophages induced in vitro by macrophage colony-stimulating factor are deficient in IL-12 production. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 8, p. 2498-2507, Aug 1998. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000075381100025 >.

SODDU, G. et al. Interference of some tryptophan metabolites in the formation of melanin in vitro. **Pigment Cell Res,** v. 17, n. 2, p. 135-41, Apr 2004. ISSN 0893-5785. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15016302 >.

SOUSA, M. G. et al. Monocyte-derived dendritic cells from patients with severe forms of chromoblastomycosis induce CD4(+) T cell activation in vitro. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 156, n. 1, p. 117-125, Apr 2009. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000264065200015 >.

SOYBIR, G. et al. The effects of melatonin on angiogenesis and wound healing. **Surgery Today**, v. 33, n. 12, p. 896-901, Dec 2003. ISSN 0941-1291. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000187185700003 >.

SPEECKAERT, R. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase, a new prognostic marker in sentinel lymph nodes of melanoma patients. **European Journal of Cancer,** v. 48, n. 13, p. 2004-2011, Sep 2012. ISSN 0959-8049. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000307884500010 >.

SQUIRES, L. et al. Serotonin catabolism and the formation and fate of 5-hydroxyindole thiazolidine carboxylic acid. **J Biol Chem,** v. 281, n. 19, p. 13463-70, May 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li st_uids=16537538 >. SRINIVASAN, V. et al. Immunomodulation by melatonin: Its significance for seasonally occurring diseases. **Neuroimmunomodulation,** v. 15, n. 2, p. 93-101, 2008 2008. ISSN 1021-7401. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258878900001 >.

STONE, T. W.; PERKINS, M. N. QUINOLINIC ACID - A POTENT ENDOGENOUS EXCITANT AT AMINO-ACID RECEPTORS IN CNS. **European Journal of Pharmacology,** v. 72, n. 4, p. 411-412, 1981 1981. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1981MA40700024 >.

SUGDEN, D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. **Experientia**, v. 45, n. 10, p. 922-32, Oct 1989. ISSN 0014-4754. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2572451 >.

SUZUKI, Y. et al. Increased serum kynurenine/tryptophan ratio correlates with disease progression in lung cancer. **Lung Cancer,** v. 67, n. 3, p. 361-365, Mar 2010. ISSN 0169-5002. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275776000017 >.

SWANN, J. B.; SMYTH, M. J. Immune surveillance of tumors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1137-1146, May 2007. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000246347000004 >.

TAN, D. et al. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. **J Pineal Res**, v. 34, n. 4, p. 249-59, May 2003. ISSN 0742-3098. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li st_uids=12662346 >.

TAVINTHARAN, S.; LIM, S. C.; SUM, C. F. Effects of Niacin on Cell Adhesion and Early Atherogenesis: Biochemical and Functional Findings in Endothelial Cells. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology,** v. 104, n. 3, p. 206-210, Mar 2009. ISSN 1742-7835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263329000004 >.

TEKES, K. HPLC determination of serotonin and its metabolites from human platelet-rich plasma; shift to 5-hydroxytryptophol formation following alcohol consumption. **J Chromatogr Sci**, v. 46, n. 2, p. 169-73, Feb 2008. ISSN 0021-9665. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18366879 >.

TERNESS, P. et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenaseexpressing dendritic cells: Mediation of suppression by tryptophan metabolites. **Journal of Experimental Medicine,** v. 196, n. 4, p. 447-457, Aug 19 2002. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000177669300004 >. TEULINGS, F. A. et al. CONCENTRATION OF FREE AND CONJUGATED 3-HYDROXYANTHRANILIC ACID IN URINE OF BLADDER TUMOR PATIENTS BEFORE AND AFTER THERAPY, MEASURED WITH AN ENZYMATIC METHOD. **British Journal of Cancer,** v. 27, n. 4, p. 316-322, 1973 1973. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1973P510600006 >.

THOMAS, S.; WITTING, P.; DRUMMOND, G. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal,** v. 10, n. 10, p. 1713-65, Oct 2008. ISSN 1557-7716. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18707220 >.

THOMAS, S. R.; MOHR, D.; STOCKER, R. NITRIC-OXIDE INHIBITS INDOLEAMINE 2,3-DIOXYGENASE ACTIVITY IN INTERFERON-GAMMA PRIMED MONONUCLEAR PHAGOCYTES. Journal of Biological Chemistry, v. 269, n. 20, p. 14457-14464, May 20 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994NM06500026 >.

TISZLAVICZ, Z. et al. Different inhibitory effects of kynurenic acid and a novel kynurenic acid analogue on tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production by mononuclear cells, HMGB1 production by monocytes and HNP1-3 secretion by neutrophils. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology,** v. 383, n. 5, p. 447-455, May 2011. ISSN 0028-1298. Disponível em: < Go to ISI>://WOS:000290546900002 >.

TORMO, D. et al. Targeted Activation of Innate Immunity for Therapeutic Induction of Autophagy and Apoptosis in Melanoma Cells. **Cancer Cell,** v. 16, n. 2, p. 103-114, Aug 2009. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268762400007 >.

TOURINO, M. C. et al. Tryptamine and dimethyltryptamine inhibit indoleamine 2,3 dioxygenase and increase the tumor-reactive effect of peripheral blood mononuclear cells. **Cell Biochemistry and Function,** v. 31, n. 5, p. 361-364, Jul 2013. ISSN 0263-6484. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000322154400001 >.

URABE, K. et al. The inherent cytotoxicity of melanin precursors: a revision. **Biochim Biophys** Acta, v. 1221, n. 3, p. 272-8, Apr 1994. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8167148</u> >.

VAN GOOL, A. R. et al. Pegylated interferon-alpha 2b treatment in melanoma patients: influence on amino acids, 5-hydroxyindolacetic acid and pteridine plasma concentrations. **Anti-Cancer Drugs**, v. 15, n. 6, p. 587-591, Jul 2004. ISSN 0959-4973. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222792600007 >.

VAN GOOL, F. et al. Intracellular NAD levels regulate tumor necrosis factor protein synthesis in a sirtuin-dependent manner. **Nature Medicine,** v. 15, n. 2, p. 206-210, Feb 2009. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263119400024 >.

VAN KEMPEN, L. et al. The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution. **European Journal of Cell Biology,** v. 82, n. 11, p. 539-548, Nov 2003. ISSN 0171-9335. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000187637800001 >.

VERRECK, F. A. W. et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10producing type 2, macrophages subvert, immunity to (myco)bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 101, n. 13, p. 4560-4565, Mar 30 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000220648700043 >.

WANG, J. H. et al. Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. **Journal of Biological Chemistry,** v. 281, n. 31, p. 22021-22028, Aug 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000239387100049 >.

WARBURG, O.; WIND, F.; NEGELEIN, E. The metabolism of tumors in the body. **Journal of General Physiology,** v. 8, n. 6, p. 519-530, Mar 1927. ISSN 0022-1295. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000202000200002 >.

WAY, K. J. et al. The generation and properties of human macrophage populations from hemopoietic stem cells. **Journal of Leukocyte Biology,** v. 85, n. 5, p. 766-778, May 1 2009. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000266635800004 >.

WEBER, W. P. et al. Differential effects of the tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid on the proliferation of human CD8(+) T cells induced by TCR triggering or homeostatic cytokines. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 2, p. 296-304, Feb 2006. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000235404500006 >.

WEINLICH, G. et al. Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients. **Dermatology,** v. 214, n. 1, p. 8-14, 2007 2007. ISSN 1018-8665. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243078900004 >.

______. Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients. **Dermatology,** v. 214, n. 1, p. 8-14, 2007. ISSN 1018-8665. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li st_uids=17191041 >.

XIANG, Z. et al. Long-term maintenance of mature hippocampal slices in vitro. J Neurosci Methods, v. 98, n. 2, p. 145-54, Jun 2000. ISSN 0165-0270. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&li</u> <u>st_uids=10880828</u> >.

XIMENES, V. F. et al. Superoxide-dependent oxidation of melatonin by myeloperoxidase. Journal of Biological Chemistry, v. 280, n. 46, p. 38160-38169, Nov 18 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000233239800008 >. YAMAGUCHI, Y.; HEARING, V. J. Physiological factors that regulate skin pigmentation. **Biofactors,** v. 35, n. 2, p. 193-9, 2009 Mar-Apr 2009. ISSN 0951-6433. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19449448</u> >.

YASUI, H. et al. INTERFERON ENHANCES TRYPTOPHAN-METABOLISM BY INDUCING PULMONARY INDOLEAMINE 2,3-DIOXYGENASE - ITS POSSIBLE OCCURRENCE IN CANCER-PATIENTS. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 83, n. 17, p. 6622-6626, Sep 1986. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1986D837900081 >.

ZAHER, S. S. et al. 3-Hydroxykynurenine Suppresses CD4(+) T-Cell Proliferation, Induces T-Regulatory-Cell Development, and Prolongs Corneal Allograft Survival. **Investigative Ophthalmology & Visual Science,** v. 52, n. 5, p. 2640-2648, Apr 2011. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000290111000018 >.

ZAIDI, M. R. et al. Interferon-gamma links ultraviolet radiation to melanomagenesis in mice. **Nature,** v. 469, n. 7331, p. 548-U129, Jan 27 2011. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000286596500036 >.

______. Interferon-γ links ultraviolet radiation to melanomagenesis in mice. **Nature,** v. 469, n. 7331, p. 548-53, Jan 2011. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248750</u> >.

ZHU, W. et al. Quantitative profiling of tryptophan metabolites in serum, urine, and cell culture supernatants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 10, p. 3249-3261, Dec 2011. ISSN 1618-2642. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000297159900020 >.

8.0. ANEXOS

8.1. Tabelas Estatística dos Resultados.

Nas próximas páginas serão apresentadas as tabelas com os resultados das análises estatísticas realizadas para o estudo do metabolismo de Trp em células normais da pele, linhagens tumorais de melanoma humano e células imunológicas.

Basal vs IFN-	Trp	KYN	KYM	AA	KA	XA	HK	HAA	QA	NA	NAM	SER	HIAA	MLT	AFMK	AMK	DMT	TRY	IAA
WM-1366	0,6623	0,0001	**	P<0.0001	0,1524	0,8294	*	0,0341	0,021	0,0336	0,4307	0,7069	0,8546	**	**	**	**	0,6309	0,6371
UACC-62	0,0267	P<0.0001	**	0,0001	P<0.0001	0,1441	0,5626	*	0,0024	0,0022	0,1045	0,0005	0,0045	**	**	**	**	*	0,8091
SK-Mel-19	0,1282	0,0118	**	0,0166	0,1222	0,0778	0,0004	0,0711	0,0651	0,0556	0,0312	0,6705	0,6616	**	**	**	**	0,9607	0,5889
SK-Mel-29	0,0167	0,0066	**	0,9542	0,6806	0,7428	*	*	0,2975	0,0118	0,1475	0,0599	0,639	**	**	**	**	0,3095	0,7355
SK-Mel-147	P<0.0001	P<0.0001	**	0,0002	P<0.0001	0,3855	P<0.0001	*	0,5227	0,0856	0,0181	0,6179	0,0031	**	**	**	**	*	0,0822
Fibroblasto	P<0.0001	P<0.0001	**	0,0424	0,033	0,4062	0,8593	0,5508	0,445	0,3173	0,5242	0,2145	0,2415	**	**	**	**	0,8482	0,0337
Melanócito	P<0.0001	P<0.0001	**	0,0132	0,0006	*	0,002	0,0022	*	0,0161	0,0202	*	0,1318	**	**	**	**	*	0,3739
Monócito	0,0003	0,0006	0,0629	0,0181	0,0766	0,005	**	**	0,0046	0,5914	**	0,0872	0,2448	*	*	*	*	0,0766	0,6018
M1	0,4167	0,0121	*	0,5421	0,1795	*	**	**	0,0065	0,0522	**	0,345	0,0213	*	P<0.0001	*	*	*	*
M2	0,0015	0,0328	0,1428	0,0003	0,0239	0,0013	**	**	0,1357	0,3472	**	0,3716	0,5301	0,0006	0,0309	*	0,0641	0,563	*
Dim	0,0019	0,0005	0,0159	0,0005	0,2201	0,0013	**	**	0,0004	*	**	0,0435	0,4957	*	P<0.0001	*	0,0002	0,18	0,2158
Dm	0,002	0,0017	*	P<0.0001	0,5113	0,0053	**	**	0,0011	*	**	0,2433	0,6968	*	*	*	*	0,8712	0,5977
L	0,7682	0,0005	*	0,1213	0,0193	0,3165	**	**	0,8779	0,6025	**	0,5159	0,0232	0,0532	P<0.0001	0,0017	0,0628	0,0193	0,0014
N	0,2599	0,8881	*	0,3232	0,6748	0,48	**	**	0,3122	0,2611	**	0,6875	0,0132	*	0,0004	0,0007	*	0,2395	*

Tabela 7: Estatística: Efeito de IFN-γ sob	re o metabolismo basal de células.
--	------------------------------------

Tabela 8: Estatística: Efeito de 1-MT sobre o metabolismo basal de células.

	TRP	KYN	AA	KA	XA	HK	HAA	QA	NA	NAM	SER	HIAA	TRY	IAA
WM-1366	0,3303	0,3613	0,0021	P<0.0001	0,0009	*	0,929	1	0,5342	0,4433	0,7141	0,0066	0,4779	0,5361
UACC-62	0,0004	0,3559	0,0006	0,0056	0,0284	0,0306	*	0,3599	P<0.0001	0,0668	0,3906	0,0003	*	0,0058
SK-Mel-19	0,0152	0,2509	0,0002	0,0413	0,0695	0,0164	0,049	0,7484	0,9774	0,1808	0,9498	P<0.0001	0,2818	0,3902
SK-Mel-29	0,0035	0,258	0,0001	P<0.0001	0,0004	*	*	0,6919	0,212	0,4754	0,7544	0,0001	0,4201	0,0756
SK-Mel-147	P<0.0001	0,2438	0,2145	0,0001	0,434	0,001	P<0.0001	0,5686	0,4904	0,0148	0,1033	0,0147	*	0,113
Fibroblast	0,0038	0,6501	P<0.0001	0,0004	0,2911	0,276	0,8626	0,8091	0,0241	1	0,4482	P<0.0001	0,0039	0,1267
Melanocyte	0,0007	0,0907	1	0,0043	*	0,5185	*	*	0,0048	0,2912	*	0,6355	*	0,3739

Tabela 9: Estatística	: Efeito de PHA	m sobre o meta	abolismo basal (de linfócitos	e neutrófilos.
Tabela J. Estalistica			abolishio basai	ac minocitos	c neutronios.

	Linfócitos	Neutrófilos
Trp	0,0067	0,7858
KYN	P<0.0001	0,0011
KYM	0,0010	0,0041
AA	0,0013	0,0103
KA	0,51	0,9391
XA	0,0003	0,2758
QA	0,5758	0,0336
NA	0,0055	0,0413
SER	0,6015	0,1909
HIAA	0,0517	0,299
MLT	0,0107	0,0011
AFMK	0,0007	P<0.0001
AMK	0,0035	0,0068
DMT	0,0124	0,0005
TRY	0,51	0,5939

ANOVA BASAL	TRP	KYN	AA	HAA	XA	HK	KA	QA	NA	NAM	SER	HIAA	TRY	IAA
SK-Mel-29 vs SK-Mel-19	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns
SK-Mel-29 vs WM-1366	***	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	**	ns	***	*	ns	ns
SK-Mel-29 vs UACC-62	ns	ns	ns	ns	*	***	ns	***	ns	***	ns	***	***	ns
SK-Mel-29 vs SK-Mel-147	ns	ns	***	***	ns	***	ns	***	***	***	***	***	***	ns
SK-Mel-29 vs Melanócito	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	***	ns	ns	***	ns	***	ns
SK-Mel-29 vs Fibroblasto	ns	***	ns	***	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	***	ns
SK-Mel-19 vs WM-1366	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	**	ns	**	ns	ns	ns
SK-Mel-19 vs UACC-62	ns	ns	ns	***	ns	***	ns	***	ns	***	ns	***	***	ns
SK-Mel-19 vs SK-Mel-147	ns	ns	***	***	ns	***	ns	ns	***	***	***	***	***	ns
SK-Mel-19 vs Melanócito	ns	*	*	***	ns	***	ns	***	ns	ns	***	ns	***	*
SK-Mel-19 vs Fibroblasto	ns	**	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	*	ns	***	ns
WM-1366 vs UACC-62	**	ns	ns	***	ns	***	ns	***	**	**	***	***	***	ns
WM-1366 vs SK-Mel-147	***	ns	***	***	ns	***	ns	***	***	***	***	***	***	ns
WM-1366 vs Melanócito	ns	ns	*	***	**	***	ns	***	ns	ns	***	ns	***	ns
WM-1366 vs Fibroblasto	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	***	ns	***	ns
UACC-62 vs SK-Mel-147	ns	ns	***	***	ns	*	ns	***	***	*	***	***	ns	ns
UACC-62 vs Melanócito	ns	ns	*	ns	***	ns	ns	ns	ns	**	***	***	ns	ns
UACC-62 vs Fibroblasto	ns	***	ns	***	ns	***	*	***	ns	ns	ns	***	***	ns
SK-Mel-147 vs Melanócito	ns	*	***	***	**	ns	ns	***	***	***	***	***	ns	*
SK-Mel-147 vs Fibroblasto	*	**	***	***	ns	***	*	**	***	***	**	***	***	ns
Melanócito vc Fibroblasto	ns	***	ns	***	**	***	ns	***	ns	ns	***	ns	***	ns

Tabela 10: Estatística: Metabolismo basal entre células tumorais.

ANOVA IFN	TRP	KYN	AA	HAA	XA	HK	KA	QA	NA	NAM	SER	HIAA	TRY	IAA
SK-Mel-29 vs SK-Mel-19	ns	*	ns	ns	***	*	ns	ns						
SK-Mel-29 vs WM-1366	ns	***	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	***	ns	ns
SK-Mel-29 vs UACC-62	***	***	ns	ns	ns	**	***	***	*	***	*	***	***	ns
SK-Mel-29 vs SK-Mel-147	***	***	***	ns	ns	ns	***	***	***	***	**	***	***	ns
SK-Mel-29 vs Melanócito	***	***	ns	***	ns	***	***	***	ns	**	***	***	***	ns
SK-Mel-29 vs Fibroblasto	*	***	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	*	ns	ns	*	ns
SK-Mel-19 vs WM-1366	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	***	*	ns	ns
SK-Mel-19 vs UACC-62	***	***	ns	ns	ns	ns	***	***	ns	***	***	***	***	*
SK-Mel-19 vs SK-Mel-147	***	***	***	ns	ns	ns	***	*	***	***	***	***	***	ns
SK-Mel-19 vs Melanócito	***	***	ns	***	***	***	***	***	ns	***	***	ns	***	**
SK-Mel-19 vs Fibroblasto	**	***	ns	**	ns	ns	**	*						
WM-1366 vs UACC-62	***	***	ns	*	ns	**	***	***	**	**	***	***	***	ns
WM-1366 vs SK-Mel-147	***	***	***	*	ns	ns	***	***	**	***	***	***	***	ns
WM-1366 vs Melanócito	***	***	ns	***	***	***	***	***	**	*	***	ns	***	ns
WM-1366 vs Fibroblasto	**	***	ns	ns	ns	ns	ns	**	*	ns	***	**	**	ns
UACC-62 vs SK-Mel-147	ns	***	***	ns	ns	**	***	***	***	***	ns	***	ns	ns
UACC-62 vs Melanócito	ns	***	ns	***	**	***	ns	ns	ns	ns	***	***	ns	ns
UACC-62 vs Fibroblasto	**	ns	ns	ns	ns	**	***	***	ns	ns	***	***	**	ns
SK-Mel-147 vs Melanócito	ns	**	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	ns	ns
SK-Mel-147 vs Fibroblasto	**	***	***	ns	ns	ns	***	ns	***	***	***	***	**	ns
Melanócito vc Fibroblasto	**	***	ns	***	***	***	***	***	ns	ns	***	ns	**	ns

Tabela 11: Estatística: Efeito de IFN-γ entre células tumorais.

Comparação ANOVA	TRP	KVN	ΔΔ	ΗΛΛ	ΧA	HK	KA	04	NA	NAM	SFR	ΗΙΔΔ	TRV	ΤΛΛ
SK Mel 20 vs SK Mel 10	ng	nc	nn	***	ng	**	*	<u>vn</u> ***	ng	ng	*	ng	ng	ng
SK-Wel-29 v8 SK-Wel-19	115	115	115	***	*		**		115	115	***	115	*	115
SK-Mei-29 vs WM-1366	ns	ns	**	***	*	ns	~~	ns	ns	ns	***	*	т 	ns
SK-Mel-29 vs UACC-62	**	ns	ns	ns	**	***	ns	***	***	**	ns	ns	***	ns
SK-Mel-29 vs SK-Mel-147	ns	ns	***	***	*	*	ns	***	***	***	***	*	***	ns
SK-Mel-29 vs Melanócito	ns	*	*	ns	***	***	ns	***	ns	ns	***	**	***	*
SK-Mel-29 vs Fibroblasto	ns	***	ns	***	ns	ns	**	***	*	ns	ns	ns	*	ns
SK-Mel-19 vs WM-1366	ns	ns	**	ns	***	**	ns	***	ns	ns	***	ns	**	*
SK-Mel-19 vs UACC-62	***	ns	ns	***	***	***	*	***	***	*	ns	ns	***	ns
SK-Mel-19 vs SK-Mel-147	*	ns	***	***	ns	ns	ns	ns	***	***	***	ns	***	ns
SK-Mel-19 vs Melanócito	ns	**	**	***	ns	ns	ns	***	ns	ns	***	*	***	**
SK-Mel-19 vs Fibroblasto	ns	**	ns	ns	ns	**	ns	ns	*	ns	**	ns	*	*
WM-1366 vs UACC-62	*	ns	**	***	ns	***	**	***	*	ns	***	*	***	ns
WM-1366 vs SK-Mel-147	ns	ns	***	***	***	*	ns	***	***	***	***	ns	***	ns
WM-1366 vs Melanócito	ns	ns	ns	***	***	***	*	***	ns	ns	***	ns	***	ns
WM-1366 vs Fibroblasto	ns	***	ns	ns	***	ns	ns	**	ns	ns	***	*	ns	ns
UACC-62 vs SK-Mel-147	ns	ns	***	***	***	***	ns	***	***	***	***	ns	ns	ns
UACC-62 vs Melanócito	ns	ns	**	ns	***	**	ns	ns	*	*	***	**	ns	ns
UACC-62 vs Fibroblasto	ns	**	ns	***	***	***	**	***	ns	ns	ns	ns	***	ns
SK-Mel-147 vs Melanócito	ns	**	***	***	ns	ns	ns	***	***	***	***	ns	ns	*
SK-Mel-147 vs Fibroblasto	ns	**	***	***	ns	ns	*	*	***	***	***	*	***	ns
Melanócito vc Fibroblasto	ns	***	ns	***	**	***	**	***	ns	ns	***	**	***	ns

Tabela 12: Estatística: Efeito de 1-MT entre células tumorais.

ANOVA BASAL	TRP	KYN	KYM	AA	XA	KA	QA	NA	SER	HIAA	MLT	AFMK	AMK	TRY	DMT	IAA
Mono vs Mf1	***	ns	***	ns	***	***	***	ns	ns	***	ns	ns		ns	ns	***
Mono vs Mf2	ns	***	***	***	ns	***	ns	ns	*	***	***	ns		ns	ns	***
Mono vs Mf7	ns	***	***	**	ns	***	ns	**	ns	***	***	***		ns	***	***
Mono vs Dim	ns	***	***	*	ns	ns	*	***	*	***	ns	ns		ns	ns	ns
Mono vs Dm	ns	***	***	**	ns	ns	***	***	ns	***	ns	ns		ns	ns	ns
Mono vs Lf	*	***	***	**	*	ns	***	ns	***	ns	***	ns		ns	ns	***
Mono vs N	***	***	***	***	***	ns	***	ns	ns	***	ns	ns		*	ns	***
Mf1 vs Mf2	***	***	ns	***	***	**	***	*	ns	ns	***	ns		*	ns	ns
Mf1 vs Mf7	***	***	***	**	***	ns	***	**	ns	ns	***	***		ns	***	ns
Mf1 vs Dim	***	***	ns	*	***	***	**	***	ns	ns	ns	ns		**	ns	***
Mf1 vs Dm	***	***	ns	**	***	***	ns	***	ns	ns	ns	ns		ns	ns	***
Mf1 vs Lf	***	***	ns	**	***	***	ns	ns	***	***	***	ns		*	ns	ns
Mf1 vs N	***	***	ns	***	***	***	ns	ns	ns	***	ns	ns		***	ns	ns
Mf2 vs Mf7	ns	*	***	ns	ns	***		*	***	ns						
Mf2 vs Dim	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	***	ns	ns	***	ns		ns	ns	***
Mf2 vs Dm	ns	ns	ns	ns	ns	***	***	***	ns	ns	***	ns		ns	ns	***
Mf2 vs Lf	ns	ns	ns	ns	*	***	***	ns	***	***	**	ns		ns	ns	ns
Mf2 vs N	***	ns	ns	ns	***	***	***	**	***	***	***	ns		ns	ns	ns
Mf7 vs Dim	ns	**	***	ns	ns	***	ns	***	ns	ns	***	***		**	***	***
Mf7 vs Dm	ns	**	***	ns	ns	***	***	***	ns	ns	***	***		ns	***	***
Mf7 vs Lf	ns	ns	***	ns	ns	***	***	**	***	***	***	***		*	***	ns
Mf7 vs N	***	ns	***	ns	***	***	***	***	*	***	***	***		***	***	ns
Dim vs Dm	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns		ns	ns	***
Dim vs Lf	ns	*	ns	ns	*	ns	**	***	***	***	***	ns		ns	ns	***
Dim vs N	***	ns	ns	ns	***	ns	*	***	***	***	ns	ns		ns	ns	***
Dm vs Lf	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	***	***	***	***	ns		ns	ns	***
Dm vs N	***	ns	ns	ns	***	ns	ns	***	ns	***	ns	ns		***	ns	***
Lf vs N	***	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	***	***	***	ns		*	ns	ns

Tabela 13: Estatística: Metabolismo basal entre células imunológicas.
ANOVA IFN	TRP	KYN	KYM	AA	XA	KA	QA	NA	SER	HIAA	MLT	AFMK	AMK	TRY	DMT	IAA
Mono vs Mf1	ns	***	*	***	ns	***	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	*
Mono vs Mf2	ns	***	ns	***	ns	***	ns	ns	ns	***	ns	**	ns	ns	ns	*
Mono vs Dim	ns	***	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	***	ns	*	ns	ns	*	ns
Mono vs Dm	ns	***	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Mono vs Lf	***	***	ns	***	***	ns	*	ns	***	*	***	**	***	***	**	ns
Mono vs N	***	***	*	***	***	ns	**	ns	ns	***	ns	***	***	ns	ns	*
Mf1 vs Mf2	ns	ns	*	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	**	ns	**	ns	ns
Mf1 vs Dim	ns	*	ns	***	ns	***	***	**	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	*
Mf1 vs Dm	ns	**	ns	ns	ns	***	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*
Mf1 vs Lf	***	ns	ns	ns	***	***	ns	ns	***	***	***	**	***	***	**	**
Mf1 vs N	***	***	ns	*	***	***	ns	ns	ns	***	ns	***	***	**	ns	ns
Mf2 vs Dim	ns	**	ns	***	ns	***	**	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*
Mf2 vs Dm	ns	**	*	*	ns	***	ns	**	ns	ns	ns	**	ns	*	ns	*
Mf2 vs Lf	***	ns	*	ns	***	***	**	ns	***	***	***	ns	***	*	*	**
Mf2 vs N	***	***	*	ns	***	***	**	ns	ns	***	ns	***	***	ns	ns	ns
Dim vs Dm	ns	ns	ns	**	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns
Dim vs Lf	***	*	ns	***	***	ns	***	*	***	***	***	ns	***	**	ns	ns
Dim vs N	***	**	ns	***	***	ns	***	**	*	***	ns	***	***	ns	*	*
Dm vs Lf	***	**	ns	*	***	ns	ns	*	***	***	***	**	***	***	**	ns
Dm vs N	***	**	ns	***	***	ns	*	**	ns	***	ns	***	***	*	ns	*
Lf vs N	*	***	ns	*	ns	ns	ns	ns	***	***	***	***	ns	*	**	**

Tabela 14: Estatística: Efeito de IFN-γ entre células imunológicas.



Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas Documento sem validade oficial FICHA DO ALUNO

9136 - 7493636/1 - Renan Orsati Cla	ra
Email:	renan@usp.br
Data de Nascimento:	01/06/1985
Cédula de Identidade:	RG - 32.517.825-2 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Faculdades Oswaldo Cruz - São Paulo - Brasil - 2008
Mestrado:	Mestre em Biologia Molecular (1) - Universidade Federal de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2010
Curso:	Doutorado
Programa:	Farmácia (Análises Clínicas)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	08/02/2011
Início da Contagem de Prazo:	08/02/2011
Data Limite para o Depósito:	09/02/2015
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Ana Campa - 08/02/2011 até o presente. E.Mail: anacampa@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 08/02/2011
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 14/03/2013
Data do Depósito do Trabalho: Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa: Data da Defesa: Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Doutorado em 08/02/2011 Matrícula de Acompanhamento em 21/07/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013) Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/07/2014 Impresso em: 26/01/15 17:44:56



Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas Documento sem validade oficial FICHA DO ALUNO

9136 - 7493636/1 - Renan Orsati Clara

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5793- 10/1	Tópicos em Análises Clínicas I	15/03/2011	27/06/2011	30	2	80	А	Ν	Concluída
FBC5753- 2/2	Processos de Invasão Celular	30/05/2011	10/07/2011	90	6	90	А	Ν	Concluída
FBC5722- 2/1	Controle Hormonal da Resposta Inflamatória	02/08/2011	22/08/2011	60	4	100	А	Ν	Concluída
FBC5757- 3/2	Tópicos em Análises Clínicas II	09/08/2011	29/11/2011	30	2	85,5	A	Ν	Concluída
FBA5728- 3/3	Aprimoramento Didático	12/09/2011	09/10/2011	60	0	0	-	Ν	Pré- matrícula indeferida
MCM5891- 1/3	Estatística Instrumental (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	04/10/2011	31/10/2011	60	4	100	A	Ν	Concluída
FBC5813- 3/1	Aplicações de Cromatografia em Análises Toxicológicas	27/02/2012	04/04/2012	60	4	75	А	Ν	Concluída
FBC5748- 3/3	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	24/04/2012	05/06/2012	60	4	100	A	Ν	Concluída
EDM5791- 5/10	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/03/2013	28/06/2013	120	8	100	A	Ν	Concluída
QBQ5733- 6/3	Radicais Livres em Sistemas Biológicos (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	09/09/2013	01/12/2013	180	0	0	-	N	Matrícula cancelada
QBQ5882- 1/1	Tópicos Avançados em Biologia Tumoral (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	01/10/2013	21/10/2013	45	3	100	A	Ν	Concluída

	Créditos mínimo	Créditos mínimos exigidos C				
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese				
Disciplinas:	0	20	37			
Estágios:						
Total:	0	20	37			

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria nº 524, de 29.04.2008.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/07/2014 Impresso em: 26/01/15 17:44:56

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



9136 - 7493636/1 - Renan Orsati Clara

Comissão julgadora da tese de doutorado:						
NUSP	Nome	Vínculo	Função			
55700	Ana Campa	FCF - USP	Presidente			

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/07/2014 Impresso em: 26/01/15 17:44:56



Melanocytes are more responsive to IFN-γ and produce higher amounts of kynurenine than melanoma cells.

Journal:	Pigment Cell & Melanoma Research
Manuscript ID:	15-S-015
Manuscript Type:	Short Communication
Date Submitted by the Author:	15-Jan-2015
Complete List of Authors:	Clara, Renan; University of São Paulo, Clinical Analysis Assman, Nadine; University of Regensburg, Institute of Functional Genomics Moreno, Ana Carolina; University of São Paulo, Clinical Analysis Coimbra, Janine; University of São Paulo, Clinical Analysis Nuernberger, Nadine; University of Regensburg, Institute of Functional Genomics Dettmer-Wilde, Katja; University of Regensburg, Institute of Functional Genomics Oefner, Peter; University of Regensburg, Institute of Functional Genomics Campa, Ana; University of São Paulo, Clinical Analysis
Keywords:	Interferon-γ, tryptophan, metabolism, kynurenine, melanoma



Melanocytes are more responsive to IFN- γ and produce higher amounts of kynurenine than melanoma cells.

Renan O. Clara¹, Nadine Assman², Ana Carolina R. Moreno¹, Janine B. Coimbra¹, Nadine Nurenberger², Katja Dettmer-Wilde², Peter J. Oefner², Ana Campa¹.

¹Department of Clinical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

² Institute of Functional Genomics, University of Regensburg, Regensburg, Germany.

Summary

One of the oldest links between increased amino acid catabolism, tumor progression and immune regulation in cancer is the augmented tryptophan (Trp) catabolism. Interferon- γ (IFN- γ) plays a central role in this phenomenon by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), the rate-limiting enzyme of Trp degradation through the kynurenine pathway. Trp consumption and kynurenine (KYN) production is related to poor prognosis in cancer, including melanomas. Besides its role in tumor immune escape, IFN- γ is believed to play a key role in the control of pigmentation homeostasis. We still lack a comprehensive understanding of the kynurenine pathway in malignant and non-malignant cells. Here we measured changes in abundance of kynurenine metabolites of tryptophan in five human melanoma lines as well as primary human skin melanocytes and fibroblasts in response to IFN- γ . In general, IFN- γ affected kynurenine metabolism in stromal skin cells more than in melanoma cells, supporting a role of IFN- γ in normal skin cell physiology and that of stromal cells in modulating the tumor microenvironment.

Significance

This study demonstrates, that IFN- γ broadly modulates Trp metabolism in both, normal skin cells and melanoma cell lines. While IFN-y impacted KYN formation the strongest, other metabolites were also affected depending on the cell type. Interestingly, the effect of IFN- γ was more prominent in stromal skin than tumor cells. This finding seems especially relevant considering the recent description of IFN- γ in pigmentation homeostasis. In addition, peri-tumoral Trp metabolism seems to be essential for tumor immune tolerance.

Increased amino acid catabolism is essential for tumor growth and immune regulation in cancer (1,2). This is especially true for the kynurenine metabolites of tryptophan (**Fig. 1**), which exert diverse biological effects and have been investigated as markers of tumor progression and therapeutic effect (3). The kynurenine pathway has been associated mostly with immune tolerance and tumor escape mechanisms by the increased expression of its rate-limiting enzymes tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO, 1.13.11.11) or the IFN- γ inducible indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO, 1.13.11.52)(4, 5). Both enzymes catalyze kynurenine (KYN) formation, which has been associated with malignancy and invasiveness of tumor cells, such as melanomas (6). The relevance of the other KP metabolites to tumour progression has been neglected for the most part (7).

KYN is the substrate of three different enzymes: kynureninase (3.7.1.3), which produces anthranilic acid (AA); kynurenine oxo-glutarate transaminase (2.6.1.7), which produces kynurenic acid (KA), and kynurenine 3-monooxygenase (1.14.13.9), which produces 3-hydroxy-L-Kynurenine (HK). Both kynurenine oxo-glutarate transaminase (2.6.1.7) and kynureninase (3.7.1.3) can hydrolyze 3-hydroxy-L-kynurenine and produce xanthurenic acid (XA) and 3-hydroxyanthranilic acid (HAA), respectively. Alternatively, HAA can be synthesized by hydroxylation of AA by anthranilate 3-monooxygenase (1.14.16.3). HAA is converted by 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase (1.13.11.6) to a semialdehyde that is rearranged to quinolinic acid (QA), or it is decarboxylated by aminocarboxymuconate-semialdehyde decarboxylase (4.1.1.45) generating picolinic acid (PA) (8). The last

Pigment Cell & Melanoma Research Proof

steps of KP are related to the nicotinamide metabolism. In brief, QA can be used by nicotinate-nucleotide diphosphorylase (2.4.2.19, also known as quinolinate phosphoribosyltransferase) to synthesize nicotinate D-ribonucleotide, which is further converted to NA by nicotinate phosphoribosyltransferase (6.3.4.21). Finally, NA can be amidated by nicotinamidase (3.5.1.19) to generate NAM. All three metabolites, QA, NA and NAM, can be used by human cells to synthesize NAD⁺ (9).

To date, the entire KP has not been investigated yet in both primary skin and melanoma cells. Here, we studied changes in abundance of KP intermediates in response to IFN- γ in five human melanoma lines as well as primary human skin melanocytes and fibroblasts. Human metastatic melanoma cell lines (SK-Mel-19, SK-Mel-29, SK-Mel-147, WM-1366 and UACC-62) and primary epidermal fibroblasts were donated by M. Soengas (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas -CNIO, Madrid, Spain). Human primary epidermal melanocytes were purchased from ATCC (PCS-200-013; LGC Standards GmbH, Wesel, Germany). Primary fibroblasts were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) (PAA Laboratories, Pasching, Austria). Primary melanocytes were cultured in Dermal Cell Basal Media (ATCC, PCS-200-030) supplemented with Melanocyte Growth Kit (ATTC, PCS-200-042), penicillin (10 IU/mL), and streptomycin (10 µg/mL). Melanoma cell lines were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (PAA Laboratories). RPMI and DMEM were supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories), penicillin (100 IU/mL), and streptomycin (100 µg/mL). All cells were maintained at 37°C under 5% CO₂ atmosphere in 75 cm² bottles (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). For the stimulation experiments, cells were seeded in six-well plates (9.6 cm²/well, Greiner Bio-One) and cultured with the respective medium for 24 h, before the media were exchanged for supplemented RPMI with or

without IFN- γ (1000 IU/mL) (Imunik, Boehringer Ingelheim, Germany). After 24 h, tryptophan and its kynurenine metabolites were extracted from 100 µL of cell culture supernatant by the addition of ice-cold methanol (400 µL) and internal standard mix (10 µL) at -20°C for 1 h following a previously published protocol (10). Extracts were then centrifuged at 10.000 x *g* for 10 min at 4°C and the supernatants collected and dried by vacuum evaporation (CombiDancer, Hettich AG, Bach, Switzerland). Prior to analysis, samples were reconstituted with 100 µL of 0.1% formic acid in water and injected into an Agilent 1200 SL HPLC system coupled to a 4000 QTRAP[®] (AB Sciex, Framingham, MA, USA) mass spectrometer. The Student t-test, as implemented in the GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc.), was used to test the effect of IFN- γ on kynurenine metabolism. To control for multiple testing, the Bonferroni correction was used to adjust the significance threshold to 0.00079 based on a total of n=63 comparisons made (Table 1).

IFN-γ induced Trp consumption significantly only in one of the five melanoma cell lines studied, namely SK-Mel-147 (Fig. 2, Table 1). It also induced almost complete Trp depletion in primary melanocyte and fibroblast cell cultures (Fig. 2).

Among melanoma cell lines, the increments in extracellular levels of KYN that were induced by IFN- γ ranged from 4- to 50-fold. As tumor cells are obligatory targets for IFN- γ (11), the observed differences in KYN abundance may be the result of differences in the expression of IFN- γ receptors (IFNGR 1 and 2) or due to abnormal JAK1/2 or STAT1 expression between the melanoma cell lines studied.

In normal cells, the KYN increment caused by IFN- γ ranged from 25-fold in fibroblasts to 76-fold in melanocytes. The ability of IFN- γ to affect normal cell metabolism may contribute to skin processes such as the recently identified role of

IFN- γ in melanosome maturation and, thus, pigmentation homeostasis (12). Further, IFN- γ has been implicated in the induction of UV light–mediated melanomagenesis, possibly by creating immune tolerance to UV-transformed cells (13). Given our data and the observation of peritumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression in melanoma (14), it appears intriguing to speculate, that stromal cells in the tumor microenvironment produce most of the KYN required for the immune escape of melanoma cells (14).

Kynurenic acid (KA) is also considered an immunosuppressive metabolite associated with cancer invasiveness (15). It was consumed (dashed line in **Figure 2** corresponds to the concentration of KA measured in media without cells) by all cells studied under basal conditions. IFN- γ , however, caused SK-Mel-147 to secrete KA and inhibited its consumption by UACC-62 and primary melanocytes, respectively.

KYN can be hydroxylated to generate HK, which can then be converted to either XA or HAA. In the present study, both normal skin cells and the melanoma cell lines UACC-62 and SK-Mel-147 were able to synthesize HK under basal conditions. Addition of IFN- γ led to an increase in HK secretion in primary melanocytes only (p 0.002). It is known, that HK can suppress lymphocyte proliferation (T-CD4⁺) and induce T-reg development (16). Consequently, synthesis and excretion of HK and KYN by normal cells may be a major determinant of immune escape by melanoma cells. Glycosylated HK is considered the major tryptophan-derived human lens UV filter compound and it has the capability to absorb UVA light and cause the oxidation of ascorbic acid (17). Interesting, IFN- γ is related to pigmentation in skin damaged by UV light (18). Together, these findings support a role for IFN- γ in counteracting the UV damage response by increasing Trp metabolism. If true, this mechanism is lost by tumor cells. Although IFN- γ did not change XA levels, melanocytes were the only cells that totally consumed this metabolite from the culture media under basal conditions, suggesting a biological relevance of XA for normal melanocytes that has yet to be identified.

Only melanocytes and SK-Mel-147 produced and excreted AA under basal conditions, while HAA was solely produced by Sk-Mel-19, WM-1366, and fibroblasts. IFN- γ affected AA production similarly to that of KYN, while the synthesis of HAA was only upregulated in melanocytes (p 0.0022). Both molecules (AA and HAA) can autooxidize and generate mutagenic anthranilyl radical intermediates that, like KYN, can interact with the AhR receptor (19), which is among other functions responsible for melanogenesis regulation (20). The response mediated by IFN- γ in increasing HAA in cultured melanocytes can also promote immune tolerance. It is known that HAA changes homeostatic proliferation of CD8+T cells (21) and it is presumably involved in the etiology of bladder cancer (22). On the other hand, HK and HAA can protect cells from peroxyl radical-mediated oxidative damage (23), thus representing a local antioxidant defense against UV light damage or tumor inflammation.

HAA can be converted to either picolinic acid or quinolinic acid (QA), which can be further metabolized to nicotinic acid (NA) and nicotinamide (NAM). The small amounts of QA present in the cell culture media were totally consumed by the primary melanocytes, and mostly by the melanoma cell line UACC-62. Interestingly, QA is an agonist of the NMDA receptor (24), necessary for melanocyte morphology maintenance (25). Of the remaining cell lines, SK-Mel-29 and WM-1366 neither consumed nor secreted QA, while SK-Mel-19, SK-Mel-147, and the primary fibroblasts secreted small amounts of QA. IFN- γ did not affect QA abundance. Recently, QA synthesis was reported in microglia but not by glioma cells (26).

Pigment Cell & Melanoma Research Proof

NA was totally consumed by almost all cells except for SK-Mel-147, which in turn consumed NAM. Recently, NAM consumption from culture media was observed for normal but not for transformed hepatocytes (27). This difference between normal and cancer cells was not observed here for the melanocyte-melanoma pair. IDO activity is believed to maintain NAD levels through its *de novo* synthesis from Trp during inflammation (3). Besides, NAD re-synthesis is crucial for continuous cancer cell proliferation (28) and the synthesis of its substrates (QA, NA and NAM) was not notably affected by IFN- γ .

Concluding, IFN- γ was able to modulate KP metabolites in both the normal and malignant skin cells studied. The data support the hypothesis, that peritumoral rather than tumoral production of kynurenine induces immune tolerance in the tumor microenvironment. Further, the Trp metabolic pattern of transformed cells did not differ from that of non-transformed melanocytes under basal conditions, while IFN- γ treatment increased specifically HAA and HK levels in the non-transformed cell, probably due to the role of these metabolites in normal skin physiology that might be lost in tumor cells.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (process 2010/18477-0), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (process 236462/2012-1), and the German Research Foundation (KFO262). We also acknowledge the scholarships awarded by FAPESP to R. Clara and A.C.R. Moreno, and from CNPq to R. Clara and J.B. Coimbra. Further, we thank Ariane Rivellis Julio for the preparation of Figure 1. The authors declare no conflict of interest.

References

- 1. Cantor JR, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. Cancer Discov. 2012;2(10):881-98.
- 2. Boyland E, Williams DC. The metabolism of tryptophan .2. The metabolism of tryptophan in patients suffering from cancer of the bladder. Biochemical J. 1956;64(3):578-82.
- 3. Leppanen VV, Oka M. Metabolism of tryptophan in cancer of various sites. Ann Med Exp Et Biol Fenn. 1963;41(2):123-37.
- 4. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. J. Clin. Invest. 2007;117(5):1137-46.
- 5. Pilotte L, Larrieu P, Stroobant V, Colau D, Dolusic E, Frederick R, et al. Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(7):2497-502.
- 6. Weinlich G, Murr C, Richardsen L, Winkler C, Fuchs D. Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients. Dermatology. 2007;214(1):8-14.
- 7. Adams S, Braidy N, Bessesde A, Brew BJ, Grant R, Teo C, et al. The Kynurenine Pathway in Brain Tumor Pathogenesis. Cancer Res. 2012;72(22):5649-57.
- 8. Peters JC. Tryptophan nutrition and metabolism an overview. Adv Exp Med Biol. 1991;294:345-58.
- 9. Keszthelyi D, Troost FJ, Masclee AAM. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. Neurogastroenterology and Motility. 2009;21(12):1239-49.
- 10. Zhu W, Stevens AP, Dettmer K, Gottfried E, Hoves S, Kreutz M, et al. Quantitative profiling of tryptophan metabolites in serum, urine, and cell culture supernatants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2011;401(10):3249-61.
- 11. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. Nature Reviews Immunology. 2006;6(11):836-48.
- 12. Natarajan VT, Ganju P, Singh A, Vijayan V, Kirty K, Yadav S, et al. IFN-γ signaling maintains skin pigmentation homeostasis through regulation of melanosome maturation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(6):2301-6.
- Zaidi MR, Davis S, Noonan FP, Graff-Cherry C, Hawley TS, Walker RL, et al. Interferon-gamma links ultraviolet radiation to melanomagenesis in mice. Nature. 2011;469(7331):548-U129.
- 14. Chevolet I, Speeckaert R, Haspeslagh M, Neyns B, Krüse V, Schreuer M, et al. Peritumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression in melanoma: an early marker of resistance to immune control? Br J Dermatol. 2014;171(5):987-95.
- 15. Sagan D, Kocki T, Kocki J, Szumilo J. Serum kynurenic acid: possible association with invasiveness of non-small cell lung cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13(9):4241-4.
- 16. Zaher SS, Germain C, Fu H, Larkin DFP, George AJT. 3-Hydroxykynurenine suppresses CD4(+) T-cell proliferation, induces T-regulatory-cell development, and prolongs corneal allograft survival. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011;52(5):2640-8.

- 17. Ortwerth BJ, Bhattacharyya J, Shipova E. Tryptophan metabolites from young human lenses and the photooxidation of ascorbic acid by UVA light. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009;50(7):3311-9.
- 18. Natarajan VT, Ganju P, Ramkumar A, Grover R, Gokhale RS. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. Nature Chem Biol. 2014;10(7):542-51.
- 19. Chung K-T, Gadupudi GS. Possible roles of excess tryptophan metabolites in cancer. Environ Mol Mut. 2011;52(2):81-104.
- 20. Luecke S, Backlund M, Jux B, Esser C, Krutmann J, Rannug A. The aryl hydrocarbon receptor (AHR), a novel regulator of human melanogenesis. Pigment Cell Melanoma Res. 2010;23(6):828-33.
- 21. Reschner A, Schumacher R, et al. Differential effects of the tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid on the proliferation of human CD8+ T cells induced by TCR triggering or homeostatic cytokines. Eur J Immunol. 2006;36(2):296-304.
- 22. Teulings FA, Fokkens W, Kaalen J, van der Weff-Messing B. Concentration of free and conjugated 3-hydroxyanthranilic acid in urine of bladder tumor patients before and after therapy, measured with an enzymatic method. Br J Cancer. 1973;27(4):316-22.
- 23. Christen S, Peterhans E, Stocker R. Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: possible implication for inflammatory diseases. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87(7):2506-10.
- 24. Stone TW, Perkins MN. Quinolinic acid a potent endogenous excitant at aminoacid receptos in CNS. Eur J Pharmacol. 1981;72(4):411-2.
- 25. Hoogduijn MJ, Hitchcock IS, Smit NPM, Gillbro JM, Schallreuter KU, Genever PG. Glutamate receptors on human melanocytes regulate the expression of MiTF. Pigment Cell Research. 2006;19(1):58-67.
- Sahm F, Oezen I, Opitz CA, Radlwimmer B, von Deimling A, Ahrendt T, et al. The Endogenous Tryptophan Metabolite and NAD+ Precursor Quinolinic Acid Confers Resistance of Gliomas to Oxidative Stress. Cancer Res. 2013;73(11):3225-34.
- 27. Dettmer K, Vogl FC, Ritter AP, Zhu W, Nuernberger N, Kreutz M, et al. Distinct metabolic differences between various human cancer and primary cells. Electrophoresis. 2013;34(19):2836-47.
- 28. Chiarugi A, Dolle C, Felici R, Ziegler M. The NAD metabolome a key determinant of cancer cell biology. Nat Rev Cancer. 2012;12(11):741-52.

Legends of Figures

Figure 1. Kynurenine pathway (KP) of Trp catabolism.

Figure 2. Kynurenine Pathway metabolites of five human melanoma lines (SK-Mel-29, SK-Mel-19, WM-1366, UACC-62, SK-Mel-147) and normal skin melanocytes and fibroblasts under basal conditions (red squares) and after IFN- γ treatment (blue balls). Dashed lines represent the concentration found in supplemented RPMI.



Figure 1



 Table 1. p values (Student's T-test corrected by Bonferroni method) for differences in supernatant concentration of KP metabolites between untreated and IFN-y treated transformed and non-transformed skin cells.

Cell Type	SK-Mel-29	SK-Mel-19	WM-1366	UACC-62	SK-Mel-147	Melanocyte	Fibroblast
Trp	0,0167	0,1282	0,6623	0,0267	<0.0001	<0.0001	<0.0001
KYN	0,0066	0,0118	0,0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
KA	0,6806	0,1222	0,1524	<0.0001	<0.0001	0,0006	0,033
AA	0,9542	0,0166	<0.0001	0,0001	0,0002	0,0132	0,0424
нк	*	0,0004	*	0,5626	<0.0001	0,002	0,8593
XA	0,7428	0,0778	0,8294	0,1441	0,3855	*	0,4062
HAA	*	0,0711	0,0341	*	*	0,0022	0,5508
QA	0,2975	0,0651	0,021	0,0024	0,5227	*	0,445
NA	0,0118	0,0556	0,0336	0,0022	0,0856	0,0161	0,3173
NAM	0,1475	0,0312	0,4307	0,1045	0,0181	0,0202	0,5242

* Metabolites that could not be measured under either condition. In bold are the significant alterations (adjusted p value to 0,00079).

≇FEBS Journal



The expanding roles of 1-methyl-tryptophan (1-MT): in addition to inhibiting kynurenine production, 1-MT activates the synthesis of melatonin in skin cells

Ana C. R. Moreno, Renan O. Clara, Janine B. Coimbra, Ariane R. Júlio, Renata C. Albuquerque, Edson M. Oliveira, Silvya S. Maria-Engler and Ana Campa

Department of Clinical Analysis and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil

Keywords

1-methyl-tryptophan; indoleamine-2,3dioxygenase; melanoma; melatonin; skin cells

Correspondence

A. C. R. Moreno, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil Fax: +55 11 3813 2197 Tel: +55 11 3091 3741 E-mail: carol@usp.br

(Received 20 May 2013, revised 25 June 2013, accepted 22 July 2013)

doi:10.1111/febs.12444

Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1), the rate-limiting enzyme of tryptophan catabolism, has been strongly associated with the progression of malignancy and poor survival in melanoma patients. As a result, IDO1 is a leading target for interventions aimed at restoring melanoma immune surveillance. Here, in a scenario involving the tryptophan catabolism, we report that melatonin biosynthesis is driven by 1-methyl-tryptophan (1-MT), a competitive inhibitor of IDO1, in human fibroblasts, melanocytes and melanoma cells. In addition to melatonin biosynthesis, 1-MT induced the expression of tryptophan hydroxylase, arylalkylamine-N-acetyltransferase and hydroxyindole O-methyltransferase mRNA in fibroblasts and melanocytes. We observed a great variability in the levels of IDO1 mRNA expression and kynurenine release between skin cells and melanoma cell lines in response to interferon- γ , a classical IDO1 inducer. In this setting, melatonin was shown to downregulate kynurenine production. Furthermore, in a condition of low basal activity of IDO1, it was observed that 1-MT, as well melatonin, inhibited the proliferation of human melanoma cells. Taken together, our results suggest that 1-MT may serve as more than just a tool to disrupt tumor immune escape (via the inhibition of IDO1) because it was shown to act directly on the proliferation of human melanoma cells and induce melatonin biosynthesis in the tumor milieu. Moreover, 1-MT-mediated inhibition of IDO occurs in normal skin and melanoma cells, which addresses the possibility that all cells in the skin microenvironment can be targeted by 1-MT. Our findings provide innovative approaches into understanding tumor therapy related to the control of tryptophan metabolism by 1-MT.

Introduction

Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1), an enzyme involved in tryptophan (Trp) catabolism that converts Trp to kynurenine (Kyn) (Fig. 1), is immunosuppressive and is strongly associated with the process by which malignant melanoma cells escape immune

surveillance [1–3]. The main mechanism by which IDO drives immune escape in melanoma cells is mediated by the suppressive effects of Trp catabolism on effector T-cell function and the positive effects of this catabolism on regulatory T-cell differentiation [2–4].

Abbreviations

1-MT, 1-methyl-DL-tryptophan; AANAT, arylalkylamine-*N*-acetyltransferase; AHR, human aryl hydrocarbon receptor; HIOMT, hydroxyindole *O*-methyltransferase; IDO1, indoleamine 2,3-dioxygenase 1; IDO2, indoleamine 2,3-dioxygenase 2; IFN-γ, interferon γ; Kyn, kynurenine; TDO2, tryptophan 2,3-dioxygenase 2; TPH1, tryptophan hydroxylase; Trp, tryptophan.



Fig. 1. Trp metabolism. Trp is mainly metabolized by two pathways: the Kyn pathway and the serotoninergic/melatoninergic pathway. The rate-limiting step in the Kyn pathway is carried out by IDO1 to produce Kyn. The serotoninergic and melatoninergic pathways trigger the production of serotonin and melatonin, respectively. Their biosynthesis from Trp involves four well-defined intracellular steps catalyzed by TPH1, aromatic amino acid decarboxylase (AADC), AANAT and HIOMT.

IDO1 is overexpressed in various types of tumor cells and has been suggested to have a prognostic value in melanoma. Therefore, the upregulation of IDO1 in melanoma cells and tumor-draining lymph nodes has been shown to serve as an independent prognostic marker of less favorable prognosis and overall survival in patients with melanoma [2,3,5]. Moreover, an increased Kyn-to-Trp ratio in the serum of patients with malignant melanoma is closely related to tumor progression [6].

It is believed that IDO1 may be a leading target for interventions aimed at blocking melanoma immune escape [7], and this has also been demonstrated in experimental tumor mouse models [8]. 1-Methyltryptophan (1-MT), the gold standard for competitively inhibiting IDO1 [9], has been evaluated in clinical trials as a molecule directed at disrupting tumor tolerance [10]. In addition to blocking IDO1, the importance of 1-MT can be further highlighted due to its modulatory effects on dendritic cells, which could influence tumor growth [11].

With regard to tumor biochemistry, there is a lack of information concerning the impact of 1-MT on other routes of Trp metabolism. Since the serotoninergic and melatoninergic systems have been characterized in the main cellular population of humans [12–15] and rodent skin [16,17], one possible role for endogenous melatonin could be its action modulating cell proliferation and viability [14]. Here, we have demonstrated that melatonin biosynthesis is driven by 1-MT in skin cells and melanoma cells. We also explored the effect of 1-MT on the expression of *IDO1*, tryptophan hydroxylase (*TPH1*), arylalkylamine-*N*-acetyltransferase (*AANAT*) and hydroxyindole *O*-methyltransferase (*HIOMT*) mRNA in human fibroblasts, keratinocytes, melanocytes and melanoma cell lines. Because we observed that 1-MT induced melatonin biosynthesis, we additionally studied the effect of 1-MT and melatonin on the clonogenicity of human melanoma cells.

Results

1-MT modulates the expression of genes associated with Trp metabolism in skin cells and melanoma cell lines

We evaluated the mRNA expression of Trp-metabolizing enzymes in cells that were treated with interferon- γ (IFN- γ) and/or 1-MT. IFN- γ , a classic IDO1 inducer [18], enabled the observation of 1-MT-mediated effects in cells with low basal IDO1 expression. We observed heterogeneity in gene expression between different cell types. IFN- γ produced a strong induction of *IDO1* mRNA in all skin cell types and melanoma cell lines. The contribution of other Kyn-producing enzymes appears to be minimal, because cells did not express or expressed comparatively much lower indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (IDO2) and tryptophan 2,3-dioxygenase 2 (TDO2) mRNA than IDO1 mRNA (Fig. 2A, B,C). The results outlined above indicated that IDO1 is mainly responsible for Kyn production in skin cells and melanoma cells upon IFN-y treatment. Interestingly, among the skin cell types, fibroblasts demonstrated the greatest expression of IDO1 mRNA after IFN- γ stimulation, as this expression was ~ 2.5 and 1.5 times higher than that observed in keratinocytes and melanocytes, respectively (Fig. 2A). The induction of IDO1 mRNA in fibroblasts was similar to that observed in SK-Mel-147 cells under the same stimulation conditions. Among the melanoma cell lines, SK-Mel-147 cells were more responsive to IFN- γ -mediated upregulation of IDO1 mRNA than SK-Mel-19 cells. With regard to the transcripts associated with serotoninergic and melatoninergic pathways, there was a slight increase in the expression of TPH1, AANAT and *HIOMT* mRNA in keratinocytes treated with IFN- γ , and increases in TPH1 mRNA expression in treated SK-Mel-147 cells and AANAT and HIOMT mRNA expression in treated fibroblasts were also noted (Fig. 2D,E,F).



Fig. 2. Treatment of cells with 1-MT results in the expression of genes involved in Trp catabolism. The comparison of (A) *IDO1*, (B) *IDO2*, (C) *TDO2* and (D) *TPH1*, (E) *AANAT* and (F) *HIOMT* mRNA expression in skin cells and melanoma cell lines under different treatment conditions. In response to 1-MT treatment, upregulation of *IDO1* mRNA expression was observed in all of the cell types with the exception of keratinocytes. In addition, 1-MT upregulated the expression of *TPH1* and *HIOMT* in the fibroblasts and melanocytes. The error bars correspond to the SEM from four independent experiments. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

1-MT is a competitive inhibitor of IDO and is known to increase the expression of IDO in human cancer cells [19]. Upregulation of *IDO1* mRNA induced by 1-MT treatment was also observed in fibroblast, melanocyte and melanoma cells but not in keratinocytes (Fig. 2A). These results indicate that there is no general mechanism responsible for the effect of 1-MT on the regulation of *IDO1* mRNA expression. With the exception of keratinocytes, we also observed a slight increase in *TDO2* mRNA after treatment with 1-MT (Fig. 2C).

In relation to the serotoninergic and melatoninergic systems, melanocytes were very active and demonstrated the highest expression of *TPH1*, *AANAT* and *HIOMT* mRNA in comparison with the other cell types. Surprisingly, 1-MT induced the expression of *TPH1* and *HIOMT* mRNA in fibroblasts and melanocytes (Fig. 2D,E,F), indicating that due to the action of 1-MT these cells acquired the machinery necessary for the biosynthesis of melatonin.

1-MT reduces Kyn production and increases melatonin biosynthesis in fibroblasts, melanocytes and melanoma cells

In response to IFN- γ -mediated induction, an increase in *IDO1* mRNA expression was noted, which correlated with an enhanced IDO1 enzymatic activity in all of the cell lines. Fibroblasts and SK-Mel-147 cells produced higher levels of Kyn than keratinocytes, melanocytes and SK-Mel-19, which demonstrated that these cells responded differently to IFN- γ stimulation. 1-MT treatment clearly inhibited Kyn production in all cell types, provided that they were stimulated with IFN- γ (Fig. 3A).

Of the different types of skin cells studied, detectable levels of melatonin were observed only in melanocytes. Surprisingly, the basal concentration of melatonin was much higher in the two melanoma lines tested compared with that observed in melanocytes, which is consistent with previous studies [12]. Remarkably, in addition to inhibiting Kyn production, 1-MT treatment significantly stimulates melatonin biosynthesis in fibroblasts, melanocytes and the melanoma cell lines (Fig. 3B). Although Kyn and melatonin were present in micromolar and nanomolar concentrations, respectively, it was clear that 1-MT treatment resulted in melatonin biosynthesis, especially in the cultures of melanocytes and fibroblasts (Fig. 3B). In the latter cell type, we also observed a switch from no detectable to detectable production of melatonin. Although the melanoma lines also responded to 1-MT treatment, the induction of melatonin in these cells was



Fig. 3. 1-MT activates melatonin biosynthesis. (A) Quantification of Kyn production in the supernatants of fibroblast, keratinocyte, melanocyte and SK-Mel-19 and SK-Mel-147 cell cultures in response to 1-MT treatment, as assessed by HLPC analysis. (B) Quantification of melatonin levels in the supernatants of fibroblast, keratinocyte, melanocyte and SK-Mel-19 and SK-Mel-147 cell cultures in response to 1-MT treatment, as assessed by MS analysis. The error bars correspond to the SEM from four independent experiments. *P < 0.05; ***P < 0.001.

comparatively modest. Keratinocytes did not synthesize melatonin (or it was not detectable) and were unaffected by 1-MT treatment in our experiments (Fig. 3B).

Melatonin modulates Kyn production in fibroblasts, keratinocytes, melanocytes and the SK-Mel-19 cell line

Furthermore, we investigated whether melatonin could influence *IDO1* mRNA expression and Kyn release in skin cells and melanoma cell lines. There was heterogeneity with regard to *IDO1* mRNA expression in response to melatonin or IFN- γ /melatonin treatment, indicating that melatonin treatment had different effects on the different cell types evaluated (Fig. 4A). However, melatonin treatment produced a slight decrease in the release of IFN- γ -induced Kyn in skin cells and SK-Mel-19 cells but not in SK-Mel-147 cells (Fig. 4B), and this effect did not correlate with the effect of treatment on *IDO1* transcript levels. The inhibitory effect of melatonin on Kyn release was much lower than that observed in cells treated with 1-MT. These results indicate that the inhibition of



Fig. 4. Melatonin modulates Kyn production in skin cells and melanoma cell lines. (A) *IDO1* mRNA levels in fibroblasts, keratinocytes, melanocytes and SK-Mel-19 and SK-Mel-147 cells treated with melatonin. (B) Quantification of Kyn levels in cells by HPLC analysis after treatment with melatonin. The error bars correspond to the SEM from four independent experiments. *P < 0.05; ***P < 0.001.

Kyn synthesis driven by melatonin was modulated at the post-transcriptional level.

1-MT and melatonin treatment reduces the clonogenicity of melanoma cell lines

It has been demonstrated that 1-MT can inhibit IDO activity and act in concert with classical treatments to promote the regression of tumors in pre-clinical models [8]. However, in this context, the antitumor effects of 1-MT are thought to be immune mediated [8,11,20-22]. Here, we investigated the direct effect of 1-MT on the migratory and proliferative abilities of melanoma cell lines. Therefore, the directional migration of melanoma cell lines was evaluated by performing scratch wound healing assays, and the clonogenic assay was used to examine the effect of 1-MT on triggering the loss of reproductive integrity in melanoma cells. As shown in Fig. 5A,B, untreated wounds were used as controls for studying the progression of wound healing among melanoma cells. Cells treated with 1-MT demonstrated significant delays in wound closure, as 14% and 16% delays were observed for SK-Mel-19 and SKMel-147 cells, respectively. In the analysis of longterm colony formation, the proliferation rate of untreated SK-Mel-147 cells was 10-fold higher than



Fig. 5. The effects of 1-MT on melanoma cell migration and proliferation. (A) The optical microscopy imaging of cellular migration in SK-Mel-19 and SK-Mel-147 melanoma cells treated for 24 h and 36 h, respectively, with 1 mm 1-MT. Cells cultured in medium alone were used as reference controls. (B) Panels on the right indicate the quantification of the percentage of cells that had migrated after treatment. The error bars correspond to the SEM from six independent experiments. (C) The optical microscopy imaging of cellular colony formation in SK-Mel-19 and SK-Mel-147 melanoma cells treated for 14 days with 1 mm 1-MT. Control cells were cultured in medium alone. (D) Panels on the right indicate the average quantification of the colony area after 1-MT treatment. The error bars correspond to the SEM from two independent experiments. *P < 0.05; **P < 0.01.

that observed for SK-Mel-19 cells (Fig. 5C,D), and this phenotype may have been due to the different genetic background of the two cell lines [23]. Notably, after 15 days of treatment with 1-MT, there was a 17% drop in the reproductive ability of SK-Mel-19 to form large colonies (0.600 ± 0.016 versus 0.505 ± 0.027 , colony area in mm², P = 0.02). The strongest effect was observed in the SK-Mel-147 cell line, where cells had lost 42% of their reproductive integrity (6.36 ± 0.36 versus 3.71 ± 0.28 , colony area



Fig. 6. The effects of melatonin on melanoma cell proliferation. (A) Optical microscopy imaging of cell colony formation in SK-Mel-19 and SK-Mel-147 melanoma cells treated for 14 days with 1 mm melatonin. The control cells were cultured in medium alone. (B) The panels on the right depict the average quantification of colony area after melatonin treatment. The error bars correspond to the SEM from two independent experiments. *P < 0.05; ***P < 0.001.

in mm², P < 0.0001) (Fig. 5C,D). It is worth noting that the antiproliferative effect of 1-MT in the long-term colony formation could be observed for nine different melanoma cell lines (data not shown). These data suggest that treatment with 1-MT alone could affect melanoma migration and proliferation.

We next assessed the effects of melatonin on the proliferation of melanoma cells by performing the clonogenic assay. Melatonin treatment considerably reduced the size of the colonies that formed, demonstrating the existence of an inhibitory effect that was even greater than that induced by 1-MT. Remarkably, melatonin treatment decreased the reproductive integrity of SK-Mel-147 cells to form large colonies by 80% (6.36 ± 0.36 versus 1.25 ± 0.11 , colony area in mm², P < 0.0001) (Fig. 6A,B). In contrast, the effect on SK-Mel-19 cells was modest (0.600 ± 0.016 versus 0.510 ± 0.020 , colony area in mm², P = 0.01), with an observed reduction in reproductive ability of 15%.

Discussion

Despite the use of multiple new treatments in the form of either single agents or combinations, melanomas remain resistant to all therapies [24,25]. Due to the demand for newer strategies, the use of 1-MT has been considered as a therapeutic approach to improve T-cell-mediated tumor control [8,10]. This approach aims to disrupt tumor immune escape by inhibiting IDO, but 1-MT may also have off-target effects on various biological features that contribute to tumor progression, which could be additionally exploited. Alternatively, we have provided the first evidence of melatonin biosynthesis driven by 1-MT in human skin cells and melanoma cell lines. We found that treatment with 1-MT or melatonin produced effects on tumor cell migration and proliferation, and our findings suggest additional effects of 1-MT as an adjuvant in the treatment of melanoma.

We observed great variability in the levels of IDO1 mRNA expression and Kyn release between normal skin cells and melanoma cell lines. In particular, varying amounts of Kyn were released in fibroblasts, keratinocytes, melanocytes and melanoma cell lines (SK-Mel-19 and SK-Mel-147) in response to IFN-y. Although TDO2 seems to be important for the production of Kyn by some types of tumors [26,27], IDO1 was the enzyme mainly responsible for Kyn production in skin cells and melanoma cells upon IFN- γ treatment. Importantly, the amount of Kyn produced by fibroblasts was high and comparable with that produced by SK-Mel-147 metastatic melanoma cells (Fig. 3A). Sheipouri and collaborators recently emphasized that the role of the Kyn pathway in normal skin cells is not well understood [28]. Given the important role played by IDO in the engraftment of allogenic skin substitute in wound healing [29], the production of Kyn by fibroblasts observed in this study may contribute to the healing event. Our findings suggest that keratinocytes and melanocytes also have the capability to produce Kvn, which indicates that these cells could also contribute to the process of healing via Trp metabolism. Because IFN- γ is a good inducer of IDO in normal skin cells, this process may have a role in the maintenance or resolution of inflammatory processes in the skin.

Recently, Kyn was identified as an endogenous ligand for the human aryl hydrocarbon receptor (AHR) [30]. Immune and tumor cells respond differently to Kyn; the activation of AHR by Kyn modulates the function of dendritic cells, which leads to the generation of regulatory T cells [30-32] that promote tumor cell survival and motility [26]. These findings have elegantly linked the fields of immunology and cancer biology by providing a potential mechanism by which Kyn production helps tumor cells to overcome the immune response and progress to cause cancer [26,30-32]. Although we did not evaluate AHR, differential expression of this receptor by SK-Mel-147 and SK-Mel-19 cells may explain the different clonogenic susceptibility of these cells to 1-MT and melatonin (Figs 5 and 6). This hypothesis is currently being evaluated in studies that are ongoing in our laboratory.

Our finding that 1-MT triggers melatonin biosynthesis may have important biological consequences. It has been proposed that melatonin can regulate skin functions [12,15], and it is also known that melatonin can have an antiproliferative effect on tumor cells, including melanoma cells [33-41]. Melanomas represent a heterogeneous group of tumors [23] demonstrating diverse behaviors in response to various treatment strategies [24,25]. This diversity was observed in the two melanoma cell lines used in this study, as these presented different susceptibilities to 1-MT and melatonin in the clonogenic assay. Indeed, melatonin may act on cells via a receptor-dependent or receptor-independent mechanism. Previous studies have shown that melatonin differentially suppressed proliferation in melanoma cell lines, and this behavior could be related to specific patterns of cellular receptors and/or cytosolic binding protein expression [33,40-42]. Regardless, it is tempting to speculate that the antitumor effects of 1-MT may, at least in part, be related to increased melatonin biosynthesis in skin and melanoma cells. Locally produced melatonin may therefore contribute to the antitumor effects of 1-MT. Furthermore, one additional aspect worth noting is the fact that melatonin was shown to downregulate Kyn production (Fig. 4B).

With regard to the inhibition of Kyn production mediated by melatonin, it is possible that this effect was mediated by an inhibitory effect on IDO activity or the steps required for its activation. However, the first possibility was ruled out by previous studies of our research group (unpublished data) and others demonstrating that melatonin is not an IDO inhibitor [43]. The second possibility appears to be feasible given that melatonin is a powerful antioxidant and scavenges reactive oxygen species [44–46]. Moreover, IDO activation dependent on intracellular oxidants has not yet been identified [47–49].

Persistent chemoresistance and immunoresistance as well as secondary toxicities compromise the response to cancer treatment [50]. Future studies should investigate whether concurrent adjuvant therapy in combination with modern chemotherapy could have an impact on patient survival outcomes. In fact, the use of a combination of IDO inhibitors with other chemotherapeutic agents has been proposed [51]. Considering the findings that 1-MT induced melatonin biosynthesis, that 1-MT and melatonin treatments had antiproliferative effects, and that melatonin protected against the effects of chemotherapy [38], the response of patients to the combination of conventional drugs plus 1-MT or melatonin should be considered for the treatment of different types of tumors.

In conclusion, our findings demonstrated the following: (a) 1-MT-mediated inhibition of IDO occurs in normal skin and melanoma cells, which addresses the possibility that all cells in the skin microenvironment can be targeted by 1-MT; (b) in addition to the known effect of 1-MT on IDO inhibition, this molecule may directly act on tumor progression, as assessed in the clonogenic assay; (c) the mechanism of action of 1-MT may involve the induction of melatonin synthesis; and (d) melatonin can affect Kyn production. Because 1-MT has been proposed as an adjuvant to conventional antitumor therapy and melatonin is a well established oncostatic molecule, our results provide novel insights to understand tumor therapy regarding the control of Trp metabolism by 1-MT (Fig. 7). Other roles for 1-MT and melatonin may also broaden the combinations of treatments available against melanoma and other tumors.

Materials and methods

Cell culture conditions and treatments

The human melanoma metastatic cell lines (SK-Mel-19 and SK-Mel-147) were donated by M. Soengas (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas CNIO/Spanish National Cancer Research Center, Madrid, Spain) [23,52], and primary skin cells (keratinocytes, melanocytes and fibroblasts) were obtained from the foreskins of patients at the University Hospital (Hospital Universitário/HU-USP) and were donated by L. Maximiano (Ethics Committee 'Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo – CEP-HU/USP' no. CEP, Case 943/09). We confirm that written informed consent from the donor or the next of kin was obtained for use of the samples in our study. The melanoma cell lines and fibroblasts were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco[®], Life Technologies, Grand Island, NY, USA) and DMEM (Gib-



Fig. 7. A schema describing how 1-MT and melatonin may act on skin cells and melanoma cells. 1-MT inhibits IDO in normal skin cells and melanoma cells, suggesting that (A) cells in the skin microenvironment could be targets for 1-MT; (B) some of the effects of 1-MT could be due to the induction of melatonin synthesis; and (C) melatonin affects Kyn production. MIt, melatonin; dotted line, inhibition; continuous line, activation.

co[®]), respectively, supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco®), penicillin (50 U·mL⁻¹) and streptomycin (50 μ g·mL⁻¹). Keratinocytes were maintained in Epilife medium (SKU # M-EPICF-500, Cascade Biologics, Portland, OR, USA) supplemented with human keratinocyte growth supplement (SKU # S-001, Cascade Biologics). The melanocytes were maintained in 254CF medium (SKU # M-500-254CF, Cascade Biologics) supplemented with human melanocyte growth supplement (SKU # S-002-5, Cascade Biologics). All of the cells were maintained at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂. To prepare the samples, cells were seeded in a six-well plate and cultured in the appropriate medium for 24 h until they were 60% confluent. Next, 1-MT (Sigma, St Louis, MO, USA) or melatonin (Sigma) was added to the cell culture for 24 h (1 mM final concentration) in the absence or presence of IFN- γ (1000 units·mL⁻¹) (Peprotech, Ciudad de Mexico, DF, Mexico). The cellular supernatant was used for measuring the levels of Kyn and melatonin, and the adherent cells were harvested and used for RNA extraction. 1-MT and melatonin did not induce cell death under these conditions (data not shown).

Real-time PCR

The total RNA was extracted using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Austin, TX, USA), according to the manufacturer's instructions. RNase-free DNase (Qiagen) was used to remove any potential contamination by genomic DNA. The samples were stored at -80 °C until needed. Up to 1 µg of total RNA was reverse transcribed using the High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, USA), according to the manufacturer's instructions. We performed real-time PCR using TaqMan fluorescence energy transfer assays with an ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The primers and fluorogenic probe used in this assay were obtained from Applied Biosystems, and they were ordered as Hs00266705 g1 (GAPDH), Hs00986554 m1 (IDO1), Hs01589373 m1 (IDO2), Hs00194611 m1 (TDO2), Hs01559141 m1 (TPH1), Hs01063209 g1 (AANAT) and Hs00946627 m1 (HIOMT). For each of the real-time reactions, GAPDH was used as an endogenous housekeeping gene, and its expression did not vary according to IFN- γ , 1-MT or melatonin treatment. The relative comparison method $(2^{-\Delta\Delta CT})$ was used to compare the expression levels of mRNA.

Kyn quantification

The supernatants from cultured cells were collected for the determination of Kyn levels. Briefly, $150 \ \mu$ L of cellular supernatant was added to $1500 \ \mu$ L of ice-cold acetonitrile, mixed for 1 min, and centrifuged at 14 000 g at 4 °C for 10 min. The organic layer was transferred to a glass tube, protected from light and evaporated at room temperature

under a flow of nitrogen. The residue was dissolved in 150 µL MilliQ water and filtered using a spin-X[®] centrifuge tube filter (Corning[®] Costar[®], Sigma). Next, 40 µL was injected into an HPLC Shimadzu SCL-10A vp system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Kynurenine was separated using a Luna C18 Phenomenex column (250 mm \times 4.6 mm inner diameter column; 5 µm) with 100% acetonitrile (A) and milli-O[®] H₂O (B) as the mobile phases. The linear gradient began at A/B = 0/100 and ended at 22 min with A/B = 10/90. Next, the mobile phase was held at A/B = 0/100 for 5 min. During the entire chromatography procedure, the flow rate was set at 1 mL·min⁻¹. The detection was performed using a Diode Array SPD-M10A Shimadzu detector by selecting a wavelength of 365 nm. The sample concentrations were calculated using standard curves. The amount of Kyn found in untreated cells corresponded to the amount of Kyn found in the supplemented medium (data not shown).

Melatonin extraction and quantification

For melatonin extraction, the culture medium was separated and placed in a 15 mL Falcon tube containing 20 µL of 0.1 M NaOH and vortexed. Next, 100 uL of indole solution (100 μ g·mL⁻¹) was added as an internal standard, and the mixture was vortexed again. Then 2.5 mL of cold dichloromethane (stored at -20 °C) was added to the tube, which was vortexed continuously for 5 min and stored in an ice bath for another 5 min. Next, the tubes were centrifuged at 9.5 g for 10 min. The organic phase was transferred to a glass tube and dried under nitrogen gas flow. The samples were reconstituted by adding 150 µL of an acetonitrile-containing solution and 4 mM sodium formate (50: 50 v/v), and the tubes were vortexed for 1 min. Next, 100 µL of this solution was transferred to a Spin-X centrifuge tube with a 22 µm filter (Costar, Corning) and centrifuged for 3 min at 1 g. Subsequently, 20 µL was injected into the equipment. Melatonin quantification was performed by liquid chromatography mass spectrometry using an ESI ion source, which was operated in a positive mode. The instrumentation consisted of LC 10Avp pumps, a SIL 10ADvp auto sampler, a SCL 10ADvp controller (all purchased from Shimadzu Co.) and a Quattro-Micro Triple Quadrupole (Micromass, Manchester, UK). The following source conditions were used for the equipment: 3.27 kV capillary, 15 V cone, 1 V extractor, 0.1 V rf lens, 100 °C source temperature, 300 °C desolvation temperature, 204 $L \cdot h^{-1}$ cone gas flow, and 561 $L \cdot h^{-1}$. The desolvation gas flow and the analyzer equipment conditions were as follows: for 10 LM1 and HM1, a resolution of 0.2 V, ion energy 1, 37 entrance2, 12 collision energy, and 37 exit; and for 10 LM2 and HM2, a resolution of 2.0 V, ion energy 2, 850 V multiplier and 2.52×10^{-3} mbar gas cell pressure. Each of these conditions was optimized by infusing a standard melatonin solution (1 μ g·mL⁻¹). The analysis was performed using a MassLynx V4.0 data analysis system (Micromass, Cary, NC, USA), and the data were collected in SIR or MRM mode by selecting a transition of 232.8(M + H) > m/z of 174 for melatonin and 118 (M + H) > m/z of 89 for the internal standard, with -12 V as the collision energy. Chromatography was performed under a gradient of 4 mM ammonium formate (pH 4, in MilliO water. [®]Millipore) (referred to as buffer A) and 0.01% formic acid in acetonitrile (referred to as buffer B) at a flow rate of 0.35 mL min⁻¹. A Kinetex C18 100A $(50 \times 4.6 \text{ mm}, 2.6 \mu\text{m}; \text{Phenomenex})$ column coupled to a KrudKatcher ultra column in-line filter (Phenomenex) was used. The elution gradients for column re-equilibration were as follows: 0-1 min, 50 A : 50 B, v/v; 1-4.5 min, 0 A: 100 B, v/v; 4.5-6.5 min, 0 A: 100 B, v/v; 6.5-7 min, 50 A : 50 B, v/v; and 7-9 min, 50 A : 50 B, v/v.

Wound healing assay

To evaluate melanoma migration in response to the 1-MT treatment, cells were seeded in 24-well plates and cultured for 24 h until they reached 95% confluence. Next, the monolayers were carefully scratched with a 200 μ L pipette tip followed by the addition of fresh culture medium containing 1-MT (1 mM). The cells were photographed after appropriate incubation times using a light microscope.

Clonogenic assay

We performed the clonogenic assay to determine the effect of 1-MT or melatonin treatment on the proliferation of tumor cells. Six hundred cells were seeded in 60 mm plates and cultured for 24 h. Next, the cells were treated with 1-MT or melatonin at a final concentration of 1 mm. Treated medium was replaced every 48 h. After 15 days, the cells were fixed in glutaraldehyde (6.0% v/v) and stained with crystal violet (0.5% w/v) to observe the formation of colonies. The size of the colonies was calculated using the CARESTREAM MOLECULAR IMAGING SOFTWARE from In-Vivo MS FX-PRO (Carestream Health Inc., Woodbridge, CT, USA). Colonies were defined as groups of neighboring cells that probably originated from a single parental cell.

Statistics

The statistical significance of differences in the mean values of all experimental groups was calculated using a one-way ANOVA. P values < 0.05 were considered to be statistically significant.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the São Paulo Research Foundation – FAPESP (FAPESP 2009/14632-3, 2009/53800-9 and 2010/15919-1) and the National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (CNPq 47151012010-6). Similarly, we acknowledge the scholarship from FAPESP to A. C. R. Moreno and R. Clara and from CNPq to J. B. Coimbra.

References

- Banerjee T, Duhadaway JB, Gaspari P, Sutanto-Ward E, Munn DH, Mellor AL, Malachowski WP, Prendergast GC & Muller AJ (2008) A key *in vivo* antitumor mechanism of action of natural productbased brassinins is inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Oncogene* 27, 2851–2857.
- 2 Brody JR, Costantino CL, Berger AC, Sato T, Lisanti MP, Yeo CJ, Emmons RV & Witkiewicz AK (2009) Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival. *Cell Cycle* 8, 1930–1934.
- 3 Speeckaert R, Vermaelen K, van Geel N, Autier P, Lambert J, Haspeslagh M, van Gele M, Thielemans K, Neyns B, Roche N *et al.* (2011) Indoleamine 2,3-dioxygenase, a new prognostic marker in sentinel lymph nodes of melanoma patients. *Eur J Cancer* 48, 2004–2011.
- 4 Munn DH & Mellor AL (2007) Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest* **117**, 1147–1154.
- 5 Lee JR, Dalton RR, Messina JL, Sharma MD, Smith DM, Burgess RE, Mazzella F, Antonia SJ, Mellor AL & Munn DH (2003) Pattern of recruitment of immunoregulatory antigen-presenting cells in malignant melanoma. *Lab Invest* 83, 1457–1466.
- 6 Weinlich G, Murr C, Richardsen L, Winkler C & Fuchs D (2007) Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients. *Dermatology* 214, 8–14.
- 7 Muller AJ & Scherle PA (2006) Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Nat Rev Cancer* **6**, 613–625.
- 8 Hou DY, Muller AJ, Sharma MD, DuHadaway J, Banerjee T, Johnson M, Mellor AL, Prendergast GC & Munn DH (2007) Inhibition of indoleamine 2,3dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer Res* 67, 792–801.
- 9 Cady SG & Sono M (1991) 1-Methyl-DL-tryptophan, beta-(3-benzofuranyl)-DL-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and beta-[3-benzo(b)thienyl]-DL-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indoleamine 2,3-dioxygenase. *Arch Biochem Biophys* **291**, 326–333.

- 10 Soliman H (2010) A Phase 1 Study of 1-Methyl-D-Tryptophan in Combination with Docetaxel in Metastatic Solid Tumors. No. NCT01191216.
- 11 Agaugue S, Perrin-Cocon L, Coutant F, Andre P & Lotteau V (2006) 1-Methyl-tryptophan can interfere with TLR signaling in dendritic cells independently of IDO activity. J Immunol 177, 2061–2071.
- 12 Slominski A, Pisarchik A, Semak I, Sweatman T, Wortsman J, Szczesniewski A, Slugocki G, McNulty J, Kauser S, Tobin DJ *et al.* (2002) Serotoninergic and melatoninergic systems are fully expressed in human skin. *FASEB J* 16, 896–898.
- 13 Slominski A, Semak I, Pisarchik A, Sweatman T, Szczesniewski A & Wortsman J (2002) Conversion of L-tryptophan to serotonin and melatonin in human melanoma cells. *FEBS Lett* **511**, 102–106.
- 14 Slominski A, Pisarchik A, Zbytek B, Tobin DJ, Kauser S & Wortsman J (2003) Functional activity of serotoninergic and melatoninergic systems expressed in the skin. J Cell Physiol 196, 144–153.
- 15 Slominski A, Tobin DJ, Zmijewski MA, Wortsman J & Paus R (2008) Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends Endocrinol Metab* 19, 17–24.
- 16 Slominski A, Baker J, Rosano TG, Guisti LW, Ermak G, Grande M & Gaudet SJ (1996) Metabolism of serotonin to *N*-acetylserotonin, melatonin, and 5-methoxytryptamine in hamster skin culture. *J Biol Chem* 271, 12281–12286.
- 17 Slominski A, Pisarchik A, Semak I, Sweatman T, Szczesniewski A & Wortsman J (2002) Serotoninergic system in hamster skin. J Invest Dermatol 119, 934–942.
- 18 Yoshida R, Imanishi J, Oku T, Kishida T & Hayaishi O (1981) Induction of pulmonary indoleamine 2,3dioxygenase by interferon. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 129–132.
- 19 Opitz CA, Litzenburger UM, Opitz U, Sahm F, Ochs K, Lutz C, Wick W & Platten M (2011) The indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibitor 1-methyl-D-tryptophan upregulates IDO1 in human cancer cells. *PLoS ONE* 6, e19823.
- 20 Lob S, Konigsrainer A, Schafer R, Rammensee HG, Opelz G & Terness P (2008) Levo- but not dextro-1methyl tryptophan abrogates the IDO activity of human dendritic cells. *Blood* 111, 2152–2154.
- 21 Qian F, Villella J, Wallace PK, Mhawech-Fauceglia P, Tario JD, Andrews C, Matsuzaki J, Valmori D, Ayyoub M, Frederick PJ *et al.* (2009) Efficacy of levo-1-methyl tryptophan and dextro-1-methyl tryptophan in reversing indoleamine-2,3-dioxygenase-mediated arrest of T-cell proliferation in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 69, 5498–5504.
- 22 Sorensen RB, Kollgaard T, Andersen RS, van den Berg JH, Svane IM, Straten PT & Andersen MH (2011) Spontaneous cytotoxic T-cell reactivity against

indoleamine 2,3-dioxygenase-2. Cancer Res 71, 2038–2044.

- 23 Tormo D, Checinsk A, Alonso-Curbelo D, Perez-Guijarro E, Canon E, Riveiro-Falkenbach E, Calvo TG, Larribere L, Megias D, Mulero F *et al.* (2009) Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells. *Cancer Cell* **16**, 103–114.
- 24 Davar D & Kirkwood J (2012) New therapies in the treatment of melanoma. *Expert Opin Investig Drugs* 21, 1643–1659.
- 25 Dummer R, Rozati S, Eggmann N, Rinderknech J & Goldinger SM (2012) From chemotherapy to targeted treatment. *Ann Oncol* 23, x101–x103.
- 26 Opitz CA, Litzenburger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S, Schumacher T, Jestaedt L, Schrenk D, Welle M *et al.* (2011) An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* **478**, 197–203.
- 27 Pilotte L, Larrieu P, Stroobant V, Colau D, Dolusic E, Frederick R, De Plaen E, Uyttenhove C, Wouters J, Masereel B *et al.* (2012) Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 2497–2502.
- 28 Sheipouri D, Braidy N & Guillemin GJ (2012)
 Kynurenine pathway in skin cells: implications for
 UV-induced skin damage. *Int J Tryptophan Res* 5, 15–25.
- 29 Bahar MA, Nabai L & Ghahary A (2012) Immunoprotective role of indoleamine 2,3-dioxygenase in engraftment of allogenic skin substitute in wound healing. *J Burn Care Res* 33, 364–370.
- 30 Mezrich JD, Fechner JH, Zhang XJ, Johnson BP, Burlingham WJ & Bradfield CA (2010) An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol* 185, 3190–3198.
- 31 Bankoti J, Rase B, Simones T & Shepherd DM (2010) Functional and phenotypic effects of AhR activation in inflammatory dendritic cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 246, 18–28.
- 32 Nguyen NT, Kimura A, Nakahama T, Chinen I, Masuda K, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y & Kishimoto T (2010) Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynureninedependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 19961–19966.
- 33 Cabrera J, Negrin G, Estevez F, Loro J, Reiter RJ & Quintana J (2010) Melatonin decreases cell proliferation and induces melanogenesis in human melanoma SK-MEL-1 cells. J Pineal Res 49, 45–54.
- 34 Lissoni P, Brivio O, Brivio F, Barni S, Tancini G, Crippa D & Meregalli S (1996) Adjuvant therapy with the pineal hormone melatonin in patients with lymph node relapse due to malignant melanoma. *J Pineal Res* 21, 239–242.

- 35 Mediavilla MD, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX, Manchester L & Reiter RJ (2010) Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr Med Chem* 17, 4462–4481.
- 36 Lissoni P (2007) Biochemotherapy with standard chemotherapies plus the pineal hormone melatonin in the treatment of advanced solid neoplasms. *Pathol Biol* 55, 201–204.
- 37 Lissoni P, Malugani F, Malysheva O, Kozlov V, Laudon M, Conti A & Maestroni G (2002) Neuroimmunotherapy of untreatable metastatic solid tumors with subcutaneous low-dose interleukin-2, melatonin and naltrexone: modulation of interleukin-2induced antitumor immunity by blocking the opioid system. *Neuro Endocrinol Lett* 23, 341–344.
- 38 Lissoni P, Vaghi M, Ardizzoia A, Malugani F, Fumagalli E, Bordin V, Fumagalli L, Bordoni A, Mengo S, Gardani GS *et al.* (2002) A phase II study of chemoneuroimmunotherapy with platinum, subcutaneous low-dose interleukin-2 and the pineal neurohormone melatonin (P.I.M.) as a second-line therapy in metastatic melanoma patients progressing on dacarbazine plus interferon-alpha. *In Vivo* 16, 93–96.
- 39 Slominski A & Pruski D (1993) Melatonin inhibits proliferation and melanogenesis in rodent melanoma cells. *Exp Cell Res* 206, 189–194.
- 40 Fischer TW, Zmijewski MA, Zbytek B, Sweatman TW, Slominski RM, Wortsman J & Slominski A (2006) Oncostatic effects of the indole melatonin and expression of its cytosolic and nuclear receptors in cultured human melanoma cell lines. *Int J Oncol* 29, 665–672.
- 41 Souza AV, Visconti MA & Castrucci AM (2003) Melatonin biological activity and binding sites in human melanoma cells. J Pineal Res 34, 242–248.
- 42 Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS & Slominski AT (2012) Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol* **351**, 152–166.
- 43 Ferry G, Ubeaud C, Lambert PH, Bertin S, Cogé F, Chomarat P, Delagrange P, Serkiz B, Bouchet JP, Truscott RJ *et al.* (2005) Molecular evidence that melatonin is enzymatically oxidized in a different

manner than tryptophan: investigations with both indoleamine 2,3-dioxygenase and myeloperoxidase. *Biochem J* **388**, 205–215.

- 44 Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J & D'Arpa D (1999) Melatonin and tryptophan derivatives as free radical scavengers and antioxidants. *Adv Exp Med Bio* 467, 379–387.
- 45 Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J, D'Arpa D, Sainz RM, Mayo JC & Ramos S (1999) The oxidant/antioxidant network: role of melatonin. *Biol Signals Recept* 8, 56–63.
- 46 Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M & Calvo JR (2000) Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol Signals Recept* 9, 137–159.
- 47 Werner ER & Werner-Felmayer G (2007) Substrate and cofactor requirements of indoleamine 2,3-dioxygenase in interferon-gamma-treated cells: utilization of oxygen rather than superoxide. *Curr Drug Metab* 8, 201–203.
- 48 Sono M, Taniguchi T, Watanabe Y & Hayaishi O (1980) Indoleamine 2,3-dioxygenase. Equilibrium studies of the tryptophan binding to the ferric, ferrous, and CO-bound enzymes. *J Biol Chem* 255, 1339–1345.
- 49 Hayaishi O, Rothberg S, Mehler AH & Saito Y (1957) Studies on oxygenases; enzymatic formation of kynurenine from tryptophan. *J Biol Chem* 229, 889–896.
- 50 Muller AJ & Prendergast GC (2005) Marrying immunotherapy with chemotherapy: why say IDO? *Cancer Res* 65, 8065–8068.
- 51 Balachandran VP, Cavnar MJ, Zeng S, Bamboat ZM, Ocuin LM, Obaid H, Sorenson EC, Popow R, Ariyan C, Rossi F *et al.* (2011) Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of IDO. *Nat Med* 17, 1094–1100.
- 52 Brohem CA, Massaro RR, Tiago M, Marinho CE, Jasiulionis MG, de Almeida RL, Rivelli DP, Albuquerque RC, de Oliveira TF, de Melo Loureiro AP et al. (2012) Proteasome inhibition and ROS generation by 4-nerolidylcatechol induces melanoma cell death. Pigment Cell Melanoma Res 25, 354–369.

ELSEVIER



Biochemical Pharmacology



journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm

Biosynthesis of *N*,*N*-dimethyltryptamine (DMT) in a melanoma cell line and its metabolization by peroxidases



Melissa M. Gomes^{a,1}, Janine B. Coimbra^{a,1}, Renan O. Clara^{a,1}, Felipe A. Dörr^a, Ana Carolina R. Moreno^a, Jair R. Chagas^b, Sérgio Tufik^b, Ernani Pinto Jr^a, Luiz H. Catalani^c, Ana Campa^{a,*}

^a Department of Clinical Chemistry and Toxicology, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil ^b Department of Psychobiology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil ^c Department of Fundamental Chemistry, Universidade de Sao Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history: Received 3 December 2013 Received in revised form 23 January 2014 Accepted 24 January 2014 Available online 6 February 2014

Keywords: N,N-dimethyltryptamine (DMT) Horseradish peroxidase (HRP) Melanoma Myeloperoxidase (MPO) Tryptamine

ABSTRACT

Tryptophan (TRP) is essential for many physiological processes, and its metabolism changes in some diseases such as infection and cancer. The most studied aspects of TRP metabolism are the kynurenine and serotonin pathways. A minor metabolic route, tryptamine and *N*.*N*-dimethyltryptamine (DMT) biosynthesis, has received far less attention, probably because of the very low amounts of these compounds detected only in some tissues, which has led them to be collectively considered as trace amines. In a previous study, we showed a metabolic interrelationship for TRP in melanoma cell lines. Here, we identified DMT and N,N-dimethyl-N-formyl-kynuramine (DMFK) in the supernatant of cultured SK-Mel-147 cells. Furthermore, when we added DMT to the cell culture, we found hydroxy-DMT (OH-DMT) and indole acetic acid (IAA) in the cell supernatant at 24 h. We found that SK-Mel-147 cells expressed mRNA for myeloperoxidase (MPO) and also had peroxidase activity. We further found that DMT oxidation was catalyzed by peroxidases. DMT oxidation by horseradish peroxidase, H₂O₂ and MPO from PMA-activated neutrophils produced DMFK, N,N-dimethyl-kynuramine (DMK) and OH-DMT. Oxidation of DMT by peroxidases apparently uses the common peroxidase cycle involving the native enzyme, compound I and compound II. In conclusion, this study describes a possible alternative metabolic pathway for DMT involving peroxidases that has not previously been described in humans and identifies DMT and metabolites in a melanoma cell line. The extension of these findings to other cell types and the biological effects of DMT and its metabolites on cell proliferation and function are key questions for future studies.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Abbreviations: AFMK, N-acetyl-N-formyl-5-methoxy-kynuramine; AMK, N-acetyl-5-metoxy-kynuramine; DMEM, Dulbecco' modified eagle medium; DMFK, N,Ndimethyl-N-formyl-kynuramine; DMK, N,N-dimethyl-quinuramine; DMSO, dimethyl sulfoxide; DMT, N,N-dimethyltryptamine; DPI, diphenyliodonium; FBS, fetal bovine serum; H₂O₂, hydrogen peroxide; HRP, horseradish peroxidase; IAA, 3indoleacetic acid; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; KYN, kynurenine; LC-MS/MS, liquid chromatography-mass spectrometry; LC-UV-ESI-MS, liquid chromatography-UV detection–electrospray ionization-mass spectrometry; MAO-A, monoamine oxidase A; MPO, myeloperoxidase; *m*/z, mass-to-charge ratio; O₂⁻⁷, superoxide anion; PBS, phosphate-buffered saline; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; TDO, tryptophan 2,3-dioxygenase; TRP, tryptophan; TRY, tryptamine.

* Corresponding author at: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, CEP 05508-000, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 11 3091 3741; fax: +55 11 3813 2197

¹ These authors equally contributed to this study.

0006-2952/\$ - see front matter © 2014 Elsevier Inc. All rights reserved. http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2014.01.035 When not used for protein synthesis, the essential amino acid tryptophan (TRP) is mainly degraded (95%) through the kynurenine (KYN) pathway [1,2]. The first and rate-limiting step of this biochemical process is catalyzed by two dioxygenases: tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) [3]. The incorporation of two atoms of oxygen into the TRP indole ring and the cleavage of this ring generates the indole ring-opening product *N*-formyl-kynurenine that is then deformylated to KYN (Fig. 1A).

Another well-studied route for TRP metabolism is the serotonin pathway, which is responsible for approximately 4% of TRP metabolization [4]. Some tissues such as the pineal gland produce the hormone melatonin from serotonin [5] (Fig. 1B). Although the KYN and serotonin routes account together for almost all TRP metabolism, a small amount of TRP is converted into tryptamine (TRY) and its methylated forms monomethyl-tryptamine and *N*,*N*-

E-mail address: anacampa@usp.br (A. Campa).



Fig. 1. TRP metabolism in humans. (A) Kynurenine (KYN), (B) serotoninergic/melatoninergic and (C) tryptamine (TRY)/dimethyltryptamine (DMT) pathways.

dimethyl-tryptamine (DMT) [6] (Fig. 1C). Because of their very low concentrations in human total blood, urine, feces, lung, kidney and cerebrospinal fluid, they are collectively known as trace amines [7–10]. Although trace amines and the enzymes involved in their biosynthesis from TRP have only been found in few human tissues and fluids [6,11], information regarding DMT metabolization is even scarcer. It is known that a portion of DMT is metabolized by the enzyme monoamine oxidase A (MAO-A) into 3-indoleacetic acid (IAA), the primary known metabolite [12,13].

One difference among the three aforementioned biochemical routes of TRP metabolism is that the KYN pathway leads to loss of the indole moiety, whereas the serotonin pathway and the production of TRY and DMT preserve it (Fig. 1). The enzymes TDO and IDO specifically catalyze TRP indole ring opening and do not act on other indolic compounds [14]. However, previous studies have shown that KYN can also be generated by TRP degradation catalyzed by different peroxidases [15,16], including neutrophil myeloperoxidase (MPO).

Furthermore, peroxidases are not specific and act on different indolic compounds, leading to products that have an indole opening ring mark analogous to KYN. For example, melatonin metabolization by MPO forms *N*1-acetyl-*N*2-formyl-5-metoxy-kynuramine (AFMK) and the demethylated form *N*1-acetyl-5-metoxy-kynuramine (AMK) (Fig. 2) [15,16]. The biological relevance of KYN and KYN-like compounds is clear; KYN is a pivotal molecule for immune escape by tumors with resulting tolerance [17], and AFMK and AMK have shown several immunomodulatory effects [18,19].

Based on the information above and on the preliminary finding that SK-Mel-147 produced DMT, we studied DMT metabolization by peroxidases, including MPO, that are present in neutrophils, and decided to search for possible DMT metabolites, including indole ring-opened molecules, that could be associated with the presence of peroxidases in the SK-Mel-147 melanoma line.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and solutions

Horseradish peroxidase (HRP) type VI (EC number 1.11.1.7), dextran, Histopaque[®]-1077, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), catalase (EC 1.11.1.6), superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), 5-amino-2,3dihydro-1,4-phthalazinedione (luminol), tryptamine (TRY), dichloromethane, indole, sodium and ammonium formate, and diphenyliodonium (DPI) were purchased from Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium azide, D-glucose, KH₂PO₄, NaCl, Na₂HPO₄·12 H₂O, 29% H₂O₂, KCl, CaCl₂, MgCl₂, ammonium acetate, formic acid, HPLCgrade acetonitrile, hexane, ethyl acetate and methanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All other reagents used were of analytical grade. Dulbecco' Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) and penicillin (50 U/mL) – streptomycin (50 μ g/mL) solution were purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA).

Stock solutions of PMA were prepared in DMSO (100 μ M) and stored at -20 °C. Phosphate-buffered saline (PBS) solution (10 mM, pH 7.4) was prepared using 10 mM KCl and 140 mM NaCl. In experiments with neutrophils, 1.0 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, and 1.0 mg/mL D-glucose were added to PBS (this complete buffer is referred to as Buffer A).



2.2. Synthesis and purification of DMT

Because of the absence of a commercial standard for DMT, it was synthesized from TRY according to Bosch et al. [20] and purified by semipreparative normal-phase liquid chromatography using Shimadzu Prominence (Kyoto, Japan) equipment. Separation was achieved on a Luna Silica column (250 mm \times 10 mm, 5 μ m; Phenomenex, CA, USA) under isocratic elution employing hexane and ethyl acetate (65:35) as the mobile phase and run at 4 mL/min. The column effluent was monitored at 200–400 nm using a diode array detector (SPDM20A). Fractions of interest were collected (FRC-10A), concentrated in a rotary evaporator (Buchi, Switzerland) and further characterized by electrospray ionization mass spectrometry (Esquire HCT, Bruker Daltonics, MA, USA).

2.3. Melanoma cell line SK-Mel-147 culture

The melanoma cell line SK-Mel-147 was grown in DMEM highglucose medium supplemented with 10% FBS and penicillin (50 U/ mL) – streptomycin (50 μ g/mL) and maintained at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere. Cells were plated on 6-well plates and grown for 24 h until they reached 80% confluence.

2.4. Identification of DMT and its metabolites in SK-Mel-147 by LC–MS/MS $\,$

An indole solution in methanol (100 μ L at 100 μ g/mL) was added to the cultured cell supernatants as an internal control. Cold dichloromethane (1:2.5) was then added, and the mixture was vortexed for 3 min continuously. The tubes were centrifuged at 10,621 \times g for 10 min, and the organic phase was transferred to a glass tube protected from light and dried under nitrogen gas flow. To reconstitute samples, 150 μ L of a solution containing acetonitrile:4 mM ammonium formate (50:50) was added, and the tubes were vortexed for 1 min and centrifuged in a Spin-X centrifuge tube with a 22- μ m filter (Costar, Corning, USA) for 5 min at 239 \times g. The supernatant (20 μ L) was analyzed by LC–MS/MS.

The products found in the supernatants were separated on a Kinetex C18 column (50 mm \times 4.6 mm, 2.6 μ m; Phenomenex, Torrance, CA, USA) coupled to a KrudKatcher ultra column in-line filter (Phenomenex) at a flow rate of 0.35 mL/min under gradient elution using 4 mM ammonium formate pH 4 (solvent A) and 0.01% formic acid in acetonitrile (solvent B) as the mobile phase. The elution gradient was as follows: (i) 0–1 min (50:50), (ii) 1–6.5 min (0:100), and (iii) 6.5–9 min (50:50). We used a 320 MS triple quadrupole mass spectrometer (Varian, USA) with an electrospray ionization (ESI) source, which was operated in the positive mode.

Using a Workstation 6.9 data analysis system (Varian, USA), the data were collected in multiple reaction monitoring mode by selecting the transition m/z 189 $(M+H)^+ > 58$ for DMT, m/z 118 $(M+H)^+ > 90$ [21] for the internal standard, and -12 V as the collision energy. All of the conditions were optimized by analysis of a standard 1.0 µg/mL DMT solution.

2.5. Real-time PCR and analysis of peroxidase activity for MPO

Total RNA was extracted from cells using an RNeasy Mini kit (Qiagen). Contaminating genomic DNA was removed using the RNase-free DNase Data Set (Qiagen). Up to 1 μ g of total RNA was reverse transcribed using the High-capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems). Real-time PCR was performed using the TaqMan fluorescence energy transfer assay on an ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The primers and fluorogenic probe were from Applied Biosystems [codes Hs00266705_g1 (GAPDH) and Hs00924295_m1 (MPO)]. The

relative comparison method $(2^{-\Delta\Delta_{CT}})$ was used to compare the mRNA expression levels.

Peroxidase activity was estimated in a microplate luminometer (LB96V – EG&G Berthold). Luminol (1.0 mM) and H₂O₂ (0.5 mM) in PBS pH 7.4 were added to cell homogenates prepared from 1×10^6 cells at 37 °C.

2.6. Analysis of DMT reaction products by LC-UV-ESI-MS

DMT reaction products were separated on a Synergi Polar-RP column (250 mm \times 4.6 mm, 4 μ m; Phenomenex, Torrance, CA, USA) at a flow rate of 1.0 mL/min under gradient elution using 10 mM ammonium acetate + 0.01% formic acid (solvent A) and acetonitrile (solvent B) as the mobile phase. The column effluent was monitored at 288 nm using a diode array detector (SPD-M20A, Shimadzu Prominence, Kyoto, Japan) before being applied to an Esquire HCT iontrap mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). A flow divisor was used to divert 0.2 mL/min to the electrospray ionization (ESI) source, which was operated in the positive mode with a -3.5 kV capillary sprayer voltage. Nitrogen was used as the nebulizer (35 psi) and drying gas (5.0 L/ min, 300 °C). Helium was used as the buffer and collision gas. High-resolution mass spectrometry experiments for elemental composition confirmation were performed on a time-of-flight (TOF) mass spectrometer (MicroTOF, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA).

2.7. Oxidation of DMT by HRP/H₂O₂ system

DMT (0.1 mM) was incubated with 1.0 μ M HRP and 0.5 mM H₂O₂ in PBS (pH 7.4) in a final volume of 300 μ L under agitation (850 rpm) in a thermomixer (Eppendorf, Edison, NJ, USA) with light protection at 37 °C. The reaction was stopped after 60 min by adding 300 μ L of ice-cold acetonitrile. The sample was centrifuged at 9600 \times g for 5 min, and 20 μ L of the supernatant was analyzed by LC–UV-ESI-MS.

2.8. Isolation of human neutrophils

Purified neutrophils (98%) were obtained from healthy blood donors by Histopaque[®]-1077 centrifugation, dextran sedimentation, and hypotonic lysis of red blood cells [22]. After isolation, neutrophils were resuspended in 1.0 mL of Buffer A, and cell density was determined in a Neubauer improved bright-line chamber. Blood collection was performed according to a protocol approved by the Faculty Ethical Committee at University of São Paulo (CEP/FCF no. 109/2007).

2.9. Oxidation of DMT by activated neutrophils

Neutrophils (2.0×10^6 cells/assay) were stimulated by addition of 50 ng/mL PMA at 37 °C in Buffer A under smooth and constant agitation (350 rpm) in the dark. After 5 min, DMT (0.1 mM) was added to a final volume of 300 µL. Aliquots were taken at specific times and mixed with 300 µL of ice-cold acetonitrile to stop the reaction. Samples were centrifuged at 9600 × g for 5 min, and 20 µL of the supernatant was analyzed by LC–UV-ESI-MS.

2.10. Reaction of DMT with activated neutrophils and addition of reactive oxygen scavengers and enzyme inhibitors

Catalase (10 µg/assay), SOD (10 µg/assay), azide (1.0 mM) and DPI (20 µM) were preincubated with neutrophils (2.0×10^6 cells/mL) in 10 mM Buffer A (pH 7.4) for 5 min. After this period, cells were stimulated with 50 ng/mL PMA, and 0.1 mM DMT was added to a final volume of 300 µL. The systems were incubated under



Fig. 3. Tryptamine metabolites in SK-Mel-147 cells. Although TRY was not detected (ND) in the cell culture supernatant, DMT and DMFK were identified by LC–MS/MS. DMFK, OH-DMT and IAA were also identified after addition of 100 μM DMT to the cell culture. The data are the mean of three independent experiments with CV bellow 15%. Data are presented as the ratio of the metabolite to the internal standard. All compounds were detected below the limits of quantification.

smooth and constant agitation (350 rpm) at 37 °C. After 30 min, the reactions were stopped by addition of 300 μ L of ice-cold acetonitrile. Cells were pelleted by centrifugation (9600 × *g* for 5 min), and the supernatants were analyzed by LC–UV-ESI-MS.

2.11. Statistics

Statistical significance of differences in the mean values of all experimental groups was calculated using a one-way ANOVA. P < 0.05 was considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Identification of DMT and its metabolites in human melanoma cell cultures

SK-Mel-147 is a cell line derived from metastatic melanoma, and it was chosen for this study because we recently showed that the two main TRP metabolic pathways, that is, the KYN and serotoninergic pathways, are active in this line [23]. No previous data are available on the presence of DMT in this or other cell lines. In this study, we used LC-MS/MS to identify DMT and its precursor TRY in 24 h supernatants of cell cultures. IAA, a known metabolite of the TRY/DMT pathway, was also sought. Commercial TRY, DMT and IAA were used to optimize the LC-MS/MS analysis conditions. Using standardized conditions, we searched for the following three other potential products of DMT: *N*,*N*-dimethyl-*N*-formyl-kynuramine (DMFK), N,N-dimethyl-kynuramine (DMK) and OH-DMT. Given the lack of commercial standards for DMFK, DMK and OH-DMT, we based our search on fragmentation parameters for these compounds as described in the Materials and Methods. Surprisingly, DMT and DMFK were detected in as early as 24 h in cell culture supernatants extracted with dichloromethane. When 0.1 mM DMT was incubated with cultured cells for 24 h, OH-DMT and IAA were also detected (Fig. 3). TRY was not detected under any conditions.

3.2. Peroxidase activity of SK-Mel-147

Although it was previously thought that MPO was exclusive to phagocytes, it is currently recognized that other cell types express it [24,25]. Because DMFK was detected in SK-Mel-147 cells, we investigated MPO mRNA expression. SK-Mel-147 cells expressed MPO mRNA as shown by qPCR, and the levels of expression were not changed by the addition of TRY or DMT (Fig. 4A). We estimated the peroxidase activity in SK-Mel-147 cells by the luminol-chemiluminescent assay (Fig. 4B), as peroxidases catalyze the chemiluminescent oxidation of luminol by H₂O₂ [26]. The higher

level of light was in the presence of SK-Mel-147 cell homogenates than in the control reactions indicates the presence of an active peroxidase in this cell type.

3.3. Oxidation of DMT by the HRP/H_2O_2 system and identification of DMT metabolites

Indole ring-opening products are formed from indole compounds by reaction with reactive oxygen species in non-enzymatic pathways or in dioxygenase- or peroxidase-catalyzed reactions



Fig. 4. *MPO* mRNA expression and peroxidase activity in SK-Mel-147 cells. (A) *MPO* mRNA was expressed in SK-Mel-147 cells, and its expression was not modified by the addition of 100 μ M TRY or DMT in cell culture. (B) Peroxidase activity was measured in the SK-Mel-147 cell homogenate (1.0×10^6 cells) in the presence of luminol (1.0 mM) and H₂O₂ (0.5 mM). Data are shown as relative luminescence units (RLU). The error bars correspond to the SEM from three independent experiments.



Fig. 5. HPLC analysis of DMT oxidation by HRP/H₂O₂. DMT (0.1 mM) was incubated with HRP (1.0 μ M) and H₂O₂ (0.5 mM). UV chromatogram of DMT at 288 nm (A) at time zero; and (B) after 15 min of reaction when it was stopped by addition of one volume (300 μ L) of ice-cold acetonitrile.

[27]. The dioxygenases known to act on indoles are TDO and IDO; TDO is very specific for tryptophan, and IDO is not able to oxidize DMT [14]. However, peroxidases have been shown to be very effective in the formation of indole ring-opening products [15]. Myeloperoxidase (MPO) is the most abundant peroxidase in humans, especially in neutrophils [28].

Based on our previous studies showing that indole ring compounds are oxidized by peroxidases to products analogous to kynurenine [15], we studied the oxidation of DMT by two frequently used peroxidase systems: horseradish peroxidase (HRP)/H₂O₂ and activated human neutrophils. HRP is commercially available and is extensively used as a peroxidase model in kinetic and mechanistic studies. The addition of H₂O₂ to the native enzyme leads to the formation of compound I, which is active and capable of oxidizing different molecules, such as TRP [27] and melatonin [15,16]. Indole ring-opening products are observed in the oxidation of both molecules. The consumption of DMT and the generation of new peaks were observed by LC/UV analysis and were totally dependent on the addition of HRP and H₂O₂ (Fig. 5A and B). From the HPLC analysis, we were able to further characterize peaks 1 and 2. The products were identified by LC/ MS-MS; the m/z 189 signal and other three ions, m/z 205 (corresponding to peak 1), m/z 221 (corresponding to peak 2) and m/z 193, correspond to DMT.

Fragmentation analyses of the *m/z* 205 ion (Fig. 6A) showed the same profile for the known hallucinogens bufotenin (5-OH-DMT)

and psilocin (4-OH-DMT) [29]. Because in our experiment it was not possible to identify the real position of the hydroxyl group on the aromatic ring, it was generically named OH-DMT. MS/MS analyses of ion m/z 221 showed a neutral loss of dimethylamine (C_2H_7N) and dimethylethylamine ($C_4H_{11}N$), and the m/z 193 ion (loss of CO) was also detected. This result suggests that this compound was an indole ring-opened DMT, designated here as DMFK (Fig. 6B). The m/z 193 ion showed the same neutral loss of DMT, OH-DMT and DMFK, and the spectrum indicated the presence of the deformylated form of DMFK, DMK (Fig. 6C). The elemental composition of these three DMT metabolites were confirmed by high-resolution mass spectrometry (Micro TOF) by

3.4. Reaction of DMT with activated neutrophils

direct injection after HPLC separation (Fig. 7A and B).

Neutrophils have two important features that characterize them as a good biochemical system for peroxidase-catalyzed reactions. When activated, neutrophils organize the NADPH oxidase system to ensure an adequate supply of superoxide anion (O_2^-) and H_2O_2 [30,31]. Furthermore, they are the cells with the highest level of MPO [32]. Neutrophils can be activated by physiological and non-physiological stimuli. Here, we used the non-physiological stimulus phorbol myristate acetate (PMA). Similar to what was observed in the presence of HRP/H₂O₂, PMAactivated neutrophils oxidized DMT to OH-DMT, DMFK and DMK. Because of the relatively low yield of the reaction, the products were analyzed only by iontrap mass spectrometry and confirmed by high resolution MicroTOF (Fig. 5). The kinetics of DMT consumption and the products formed are presented in Fig. 8.

As in previous studies on the oxidation of melatonin [15] and lysergic acid diethylamide [33] by activated neutrophils, various inhibitors were added to neutrophils to establish the mechanism by which the cells form DMFK and OH-DMT (Fig. 9). The production of DMFK and OH-DMT was almost abolished when NADPH oxidase was inhibited by diphenyliodonium (DPI), showing that superoxide and/or H_2O_2 must be produced by neutrophils before they can oxidize DMT. Azide, an inhibitor of MPO, profoundly affected DMFK and OH-DMT production, thus emphasizing the need for an active peroxidase to oxidize DMT.

In terms of the response to reactive oxygen species scavengers, DMFK production was affected more by superoxide dismutase (SOD) than OH-DMT (72% versus 43% inhibition). SOD has a stronger inhibitory action than catalase on the formation of DMFK. However, the production of OH-DMT was not affected by the addition of catalase [34].

The formation of both products identified here, DMFK and OH-DMT, may occur through a peroxidase cycle that includes tryptophan [27], melatonin [15,16] and LSD [33]. Compound I of the peroxidases reacts with DMT to generate the radical DMT[•], which reacts with molecular oxygen or the superoxide anion to create a dioxetane intermediate that is cleaved to produce DMFK. The hydroxylated product could be formed by an alternative pathway involving the compound III (Fig. 10) [34].

4. Discussion

Biochemical and toxicological studies with trace amines have attracted attention because of their numerous effects on cognition, perception, satiety, and its possible participation in psychiatric [6] and neurodegenerative disorders [35,36], and even in the social/ religious framework utilizing hallucinogenic drinks prepared from plants rich in these compounds, such as Ayahuasca tea. In this study, we describe an alternative metabolic pathway for DMT that has not been previously identified in human cells. DMT-OH, DMFK



Fig. 6. Fragmentation spectra (MS/MS) of the metabolites of the DMT/HRP/H₂O₂ reaction. (A) *m/z* 205 ion (OH-DMT), (B) *m/z* 221 ion (DMFK) and (C) *m/z* 193 ion (DMK). The ESI was operated in positive mode.

and DMK were found as DMT metabolites in peroxidase-catalyzed reactions, suggesting a role for peroxidases or peroxidase-like enzyme activities in DMT metabolization. Furthermore, we detected DMT and DMFK in the supernatant of a melanoma cell line. The significance of this finding is not yet known, but it is apparent that DMT is present in a previously unsuspected variety of cells.

In recent years, knowledge of the storage, receptors and metabolism of DMT has increased. Riba et al. [37] measured DMT metabolites in volunteers who received DMT orally and concluded that oxidative deamination of DMT by MAO may not be the sole metabolic pathway in humans. In vitro and animal studies have found endogenous psychedelic tryptamines in humans [38] and also found tryptamine metabolites in the pineal gland [39]. In addition to DMT, 5-hydroxy-DMT (bufotenin, HDMT) and 5methoxy-DMT (MDMT) have been reported as endogenous substances in humans. Mcllhenny et al. [40] described N-oxidation, N-demethylation and cyclization as alternative DMT metabolic routes. Full characterization of DMT metabolites is required for cell biochemical and biology studies and also from pharmacological and toxicological points of view given the increasing interest in the potential medical applications of Ayahuasca [41]. This study addressed whether DMFK and DMT-OH are representative or minor metabolites of DMT in vivo. The presence of DMFK, but not IAA, in the supernatants of cultured melanoma cells under basal conditions suggests that DMFK may be a central DMT metabolite, at least for some cell types.

Another aspect that deserves to be considered is the possibility that the hallucinogenic activity of DMT, either endogenously produced or ingested, may be correlated with its oxidation by peroxidases, because hydroxylated compounds such as psilocin and/or bufotenin, which are known hallucinogens, are formed. It is interesting that DMT has been related to schizophrenia [42,43], and bufotenin was found in the urine of patients with schizophrenia and other mental illnesses [44,45]. DMT and psilocin have been shown to have anxiolytic activity [6,46].

Chemically, the metabolic pathway described here is similar to that described for other natural indolic compounds such as MLT [15], TRP [48] and SER [49], and for the hallucinogen lysergic acid diethylamide [33]. The common characteristic of the peroxidasecatalyzed oxidation of these indolic compounds is the indole ringopening similar to the products formed by the action of the enzyme indolamine 2,3 dioxygenase. However neither MLT [47] nor DMT [14] seems to be IDO substrates. Products from the metabolism of TRP have been described as neuroprotectants and neurotoxins. Indole ring-opening products formed from TRP and MLT, i.e., KYN and AFMK, respectively, have a strong effect on the immune system. KYN plays a central role in tolerance [17,50], and AFMK/ AMK is implicated in immune regulation [19]. DMT metabolization by peroxidases may thus be relevant in homeostasis, and especially



Fig. 7. Mass spectra (micro TOF) of the metabolites of the DMT/HRP/H₂O₂ reaction. (A) *m/z* 205 ion (OH-DMT) and (B) *m/z* 221 ion (DMFK). The ESI was operated in positive mode. Relative error in the micro TOF analysis was below 2 ppm.



Fig. 8. Kinetics of DMT consumption and formation of metabolites by activated neutrophils. PMA (50 ng/mL)-activated neutrophils (6.0×10^6 cells/assay) were incubated with DMT (0.1 mM). After 15, 30, 45 or 60 min the reactions were stopped by the addition of one volume (300μ L) of ice-cold acetonitrile. Compounds were analyzed by LC–MS/MS. The data at 60 min are the mean \pm SD of three independent experiments.


Fig. 9. Effects of reactive oxygen species scavengers on OH-DMT and DMFK produced from DMT by PMA-activated neutrophils. Catalase (10 μ g/assay), azide (1.0 mM), SOD (10 μ g/assay) and DPI (20 μ M/assay) were added to PMA (50 ng/ml)-activated neutrophils (2.0 \times 10⁶ cells/assay) in the presence of DMT (0.1 mM). The OH-DMT and DMFK metabolites were analyzed by LC–MS/MS. The data represent the integrated area of the peaks after a 15-min reaction and are presented as the mean \pm SD of five experiments.



Fig. 10. Proposed mechanism for oxidation of DMT catalyzed by peroxidases. DMFK and DMK are hypothetically formed from a dioxetane intermediate.

in diseases in which inflammation is present. Peroxidase activity is broadly found in tissues and cells, and in inflammatory conditions. Neutrophils, monocytes and macrophages may thus provide a source of peroxidases.

Acknowledgments

The authors thank the São Paulo Research Foundation (FAPESP, São Paulo) and the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq, Brasília).

References

- Peters JC. Tryptophan nutrition and metabolism an overview. Adv Exp Med Biol 1991;294:345–58.
- [2] King NJ, Thomas SR. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. Int J Biochem Cell Biol 2007;39:2167–72.
- [3] Brody JR, Costantino CL, Berger AC, Sato T, Lisanti MP, Yeo CJ, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival. Cell Cycle 2009;8:1930–4.
- [4] Nordlind K, Azmitia EC, Slominski A. The skin as a mirror of the soul: exploring the possible roles of serotonin. Exp Dermatol 2008;17:301–11.
- [5] Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. Experientia 1989;45:922–32.
- [6] Jacob MS, Presti DE. Endogenous psychoactive tryptamines reconsidered: an anxiolytic role for dimethyltryptamine. Med Hypotheses 2005;64:930–7.
- [7] Franzen FR, Gross H, Tryptamine. N,N-dimethyltryptamine, N,N-dimethyl-5hydroxytryptamine and 5-methoxytryptamine in human blood and urine. Nature 1965;206. 1052-.
- [8] Lipinski JF, Mandel LR, Ahn HS, Vandenheuvel WJA, Walker RW. Blood dimethyltryptamine concentrations in psychotic disorders. Biol Psychiatry 1974;9:89–91.

- [9] Oon MC, Murray RM, Rodnight R, Murphy MP, Birley JL. Factors affecting the urinary excretion of endogenously formed dimethyltryptamine in normal human subjects. Psychopharmacology (Berl) 1977;54:171–5.
- [10] Karkkainen J, Forsstrom T, Tornaeus J, Wahala K, Kiuru P, Honkanen A, et al. Potentially hallucinogenic 5-hydroxytryptamine receptor ligands bufotenine and dimethyltryptamine in blood and tissues. Scand J Clin Lab Invest 2005;65:189–99.
- [11] Axelrod J. Enzimatic formation psychotomimetic metabolites from normally occurring compounds. Science 1961;134:343.
- [12] Szara S. Dimethyltryptamine: its metabolism in man; the relation to its psychotic effect to the serotonin metabolism. Experientia 1956;12:441–2.
- [13] Kaplan J, Mandel LR, Stillman R, Walker RW, VandenHeuvel WJ, Gillin JC, et al. Blood and urine levels of N,N-dimethyltryptamine following administration of psychoactive dosages to human subjects. Psychopharmacologia 1974;38: 239-45.
- [14] Tourino MC, de Oliveira EM, Belle LP, Knebel FH, Albuquerque RC, Dorr FA, et al. Tryptamine and dimethyltryptamine inhibit indoleamine 2,3 dioxygenase and increase the tumor-reactive effect of peripheral blood mononuclear cells. Cell Biochem Funct 2013;31:361–4.
- [15] Silva SO, Ximenes VF, Catalani LH, Campa A. Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of melatonin by activated neutrophils. Biochem Biophys Res Commun 2000;279:657–62.
- [16] Ximenes VF, Silva SO, Rodrigues MR, Catalani LH, Maghzal GJ, Kettle AJ, et al. Superoxide-dependent oxidation of melatonin by myeloperoxidase. J Biol Chem 2005;280:38160–69.
- [17] Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. J Clin Invest 2007;117:1147–54.
- [18] Silva SO, Carvalho SR, Ximenes VF, Okada SS, Campa A. Melatonin and its kynurenin-like oxidation products affect the microbicidal activity of neutrophils. Microbes Infect 2006;8:420–5.
- [19] Silva SO, Ximenes VF, Livramento JA, Catalani LH, Campa A. High concentrations of the melatonin metabolite, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, in cerebrospinal fluid of patients with meningitis: a possible immunomodulatory mechanism. J Pineal Res 2005;39:302–6.
- [20] Joan B, Tomàs R, Montserrat A, Dolors F-F. Synthesis of 5-(sulfamoylmethyl)indoles. Tetrahedron 2001;57:1041–8.
- [21] Powers JC. The mass spectrometry of simple indoles. J Org Chem 1968;35: 2044–50.
- [22] Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. Scand J Clin Lab Invest 1968;97:77–89.
- [23] Moreno AC, Clara RO, Coimbra JB, Julio AR, Albuquerque RC, Oliveira EM, et al. The expanding roles of 1-methyl-tryptophan (1-MT): in addition to inhibiting kynurenine production, 1-MT activates the synthesis of melatonin in skin cells. FEBS J 2013;280:4782–92.
- [24] Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. Microglia and myeloperoxidase: a deadly partnership in neurodegenerative disease. Free Radic Biol Med 2008;45:726–31.
- [25] Saed GM, Jiang Z, Diamond MP, Abu-Soud HM. The role of myeloperoxidase in the pathogenesis of postoperative adhesions. Wound Repair Regen: Off Publ Wound Heal Soc [and] Eur Tissue Repair Soc 2009;17:531–9.
- [26] Hastings JW, Wilson T. Bioluminescence and chemiluminescence. Photochem Photobiol 1976;23:461–73.
- [27] Ximenes VF, Campa A, Catalani LH. The oxidation of indole derivatives catalyzed by horseradish peroxidase is highly chemiluminescent. Arch Biochem Biophys 2001;387:173–9.
- [28] Rytting ME, Kantarjian H, Albitar M. Acute lymphoblastic leukemia with Burkitt-like morphologic features and high myeloperoxidase activity. Am J Clin Pathol 2009;132:182–5. quiz 306.
- [29] Weston KM. A primer of drug action. Midwifery 1998;14:194–5.
- [30] Klebanoff SJ, Kettle AJ, Rosen H, Winterbourn CC, Nauseef WM. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. J Leukoc Biol 2013;93:185–98.

- [31] Winterbourn CC, Kettle AJ. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. Antioxid Redox Signal 2013;18:642–60.
- [32] Haptom MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophils phagossome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. Blood 1998;92:3007–17.
- [33] Gomes MM, Dörr FA, Catalani LH, Campa A. Oxidation of lysergic acid diethylamide (LSD) by peroxidases: a new metabolic pathway. Forensic Toxicol 2012;30:87–97.
- [34] Kettle AJ, Winterbourn CC. Superoxide-dependent hydroxylation by myeloperoxidase. J Biol Chem 1994;269:17146–51.
- [35] Herrera F, Martin V, Carrera P, Garcia-Santos G, Rodriguez-Blanco J, Rodriguez C, et al. Tryptamine induces cell death with ultrastructural features of autophagy in neurons and glia: possible relevance for neurodegenerative disorders. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 2006;288A:1026–30.
- [36] Paley EL, Perry G, Sokolova O. Tryptamine induces axonopathy and mitochondriopathy mimicking neurodegenerative diseases via tryptophanyl-tRNA deficiency. Curr Alzheimer Res 2013;10:987–1004.
- [37] Riba J, McIlhenny EH, Valle M, Bouso JC, Barker SA. Metabolism and disposition of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids after oral administration of ayahuasca. Drug Test Anal 2012;4:610–6.
- [38] Barker SA, McIlhenny EH, Strassman R. A critical review of reports of endogenous psychedelic N,N-dimethyltryptamines in humans: 1955–2010. Drug Test Anal 2012;4:617–35.
- [39] Barker SA, Borjigin J, Lomnicka I, Strassman R. LC/MS/MS analysis of the endogenous dimethyltryptamine hallucinogens, their precursors, and major metabolites in rat pineal gland microdialysate. Biomed Chromatogr 2013;27:1690–700.
- [40] McIlhenny EH, Riba J, Barbanoj MJ, Strassman R, Barker SA. Methodology for determining major constituents of ayahuasca and their metabolites in blood. Biomed Chromatogr 2012;26:301–13.

- [41] Liester MB, Prickett JI. Hypotheses regarding the mechanisms of ayahuasca in the treatment of addictions. | Psychoactive Drugs 2012;44:200–8.
- [42] Daumann J, Wagner D, Heekeren K, Neukirch A, Thiel CM, Gouzoulis-Mayfrank E. Neuronal correlates of visual and auditory alertness in the DMT and ketamine model of psychosis. J Psychopharmacol 2010;24:1515–24.
- [43] Wallach JV. Endogenous hallucinogens as ligands of the trace amine receptors: a possible role in sensory perception. Med Hypotheses 2009;72:91–4.
- [44] Emanuele E, Colombo R, Martinelli V, Brondino N, Marini M, Boso M, et al. Elevated urine levels of bufotenine in patients with autistic spectrum disorders and schizophrenia. Neuro Endocrinol Lett 2010;31:117–21.
- [45] Bouso JC, Gonzalez D, Fondevila S, Cutchet M, Fernandez X, Ribeiro Barbosa PC, et al. Personality, psychopathology, life attitudes and neuropsychological performance among ritual users of ayahuasca: a longitudinal study. PLoS One 2012;7:e42421.
- [46] Grob CS, Danforth AL, Chopra GS, Hagerty M, McKay CR, Halberstadt AL, et al. Pilot study of psilocybin treatment for anxiety in patients with advanced-stage cancer. Arch Gen Psychiatry 2011;68:71–8.
- [47] Ferry G, Ubeaud C, Lambert PH, Bertin S, Coge F, Chomarat P, et al. Molecular evidence that melatonin is enzymatically oxidized in a different manner than tryptophan: investigations with both indoleamine 2,3-dioxygenase and myeloperoxidase. Biochem J 2005;388:205–15.
- [48] Ximenes VF, Catalani LH, Campa A. Oxidation of melatonin and tryptophan by an HRP cycle involving compound III. Biochem Biophys Res Commun 2001;287:130–4.
- [49] Huether G, Fettkotter I, Keilhoff G, Wolf G. Serotonin acts as a radical scavenger and is oxidized to a dimer during the respiratory burst of activated microglia. J Neurochem 1997;69:2096–101.
- [50] Jia L, Tian P, Ding C. Immunoregulatory effects of indoleamine 2,3-dioxygenase in transplantation. Transpl Immunol 2009;21:18–22.