UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Programa de Pós-Graduação em Farmácia Área de Análises Clínicas

Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos para o monitoramento dos produtos das vias metabólicas do triptofano em linhagem celular de glioma humano

Ariane Rivellis Júlio

São Paulo 2015 UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Programa de Pós-Graduação em Farmácia Área de Análises Clínicas

Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos para o monitoramento dos produtos das vias metabólicas do triptofano em linhagem celular de glioma humano

Ariane Rivellis Júlio

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR Orientador: Prof. Dr. Ernani Pinto Co-Orientador: Profa. Tit. AnaCampa

São Paulo 2015

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

J94d	Júlio, Ariane Rivellis Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos para o monitoramento dos produtos das vias metabólicas do triptofano em linhagem celular de glioma humano / Ariane Rivellis Júlio São Paulo, 2015. 203p.
	Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Orientador: Pinto, Ernani Co-orientador: Campa, Ana
	 Bioquímica clínica 2. Cromatografia : Química analítica Glioma I. T. II. Pinto, Ernani, orientador. III. Campa, Ana, co- orientador.
	616.0756 CDD

Ariane Rivellis Júlio

Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos para o monitoramento dos produtos das vias metabólicas do triptofano em linhagem celular de glioma humano

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do Título de DOUTOR

> Prof. Dr. Ernani Pinto orientador/presidente

> > 10. examinador

20. examinador

30. examinador

40. examinador

São Paulo, de de 2015.

"Estude a si mesmo, observando que o auto-conhecimento traz humildade e sem humildade é impossível ser feliz".

Alan Kardec

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha amada família, em especial meus pais Ícaro e Valéria e também a minha irmã Mayara, por estarem ao meu lado, me incentivando sempre a percorrer esse caminho e a finalizar esse ciclo da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar forças nos momentos de fraqueza e me guiando a percorrer minha longa jornada.

Agradeço ao meu querido chefe Ernani, por ser esse orientador e pai para todas as horas, por me incentivar e ajudar sempre quando precisei. Você é aquele que me viu rir, chorar e desabafar diversas vezes. Agradeço a chance dada a mim por ser essa sua aluna e por receber o conhecimento que tenho hoje.

A minha co-orientadora Ana Campa, por ter paciência em me ensinar bioquímica, que é muito difícil para minha cabecinha, em discutir resultados e por ter me acolhido tão bem em seu grupo. Aos colegas do laboratório LTPNA (dos antigos aos novos: Natália, Mariah, Fabiane, Fernanda, Kazumi, Felipe, Raquel, Carlos, Miriam, Simone e Gustavo).

Aos amigos do Grupo W, que me acolheram e que onde passei os melhores momentos da minha vida de muitas risadas, obrigada Renan, Janine, Maryana, Maysa, Sika, também ao grupo SAA Luzi e Fran e o Edson.

Aos professores colaboradores que me permitiram tornar possível a realização desse trabalho. A todos os funcionários do departamento e da Faculdade de Farmácia.

Ao meu eterno companheirinho, Felipe, pelo incentivo e palavras de amor e carinho para me confortar nas horas de desespero e estresse.

E agradeço o apoio financiero da FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo processo (2012/00764-8) e demais agências de fomento CNPq e CAPES.

AMO TODOS VOCÊS e levo comigo um pedacinho de cada um para minha vida !!

JÚLIO, A. R. Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos para o monitoramento dos produtos das vias metabólicas do triptofano em linhagem celular de glioma humano. 2015. 203f. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O metabolismo do triptofano (Trp) se dá pela via das quinureninas (QUIN), pela via serotoninérgica (SER) e pela via das aminas traço. A primeira gera QUIN e uma variedade de outros metabólitos secundários. Quando conduzida pela enzima indolamina 2,3 dioxigenase (IDO) contribui para os fenômenos de tolerância e imune escape de células tumorais; e guando conduzida pela triptofano 2,3 dioxigenase (TDO) no fígado, participa na síntese da niacina e NAD. A via SER leva à formação do neurotransmissor serotonina (SER), que pode gerar o hormônio melatonina (MEL), respectivamente e outros metabólitos biologicamente ativos. Outra via menos estudada, a via das aminas traço, produz produtos neuroativos. Dada a abrangência e importância das rotas metabólicas do Trp, nós desenvolvemos e validamos uma metodologia bioanalítica robusta, seletiva e sensível por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), acoplado espectrometria de massas (MS) para a determinação simultânea do Trp e seus 15 metabólitos. Para tanto, escolhemos para a avaliação das três vias, linhagens de glioma humano. A escolha por este tipo celular deveu-se ao grande interesse de estudos de metabolismo de Trp em células tumorais, no qual células de glioma tem sido modelo. Nos ensaios com as células de glioma acompanhamos os efeitos de um indutor e inibidores da primeira etapa de metabolização do Trp pela via das quinureninas, ou seja, IFN-γ (indutor da IDO), 1-metiltriptofano (1-MT; inibidor competitivo da IDO) e 680C91 (inibidor seletivo da TDO). Pudemos observar o impacto que a indução ou a inibição do primeiro passo teve sobre os metabólitos subsequentes e as diferenças no metabolismo das duas linhagens estudadas, A172 e T98G. A linhagem T98G só tem atividade de IDO, enquanto que a A172 tem tanto atividade IDO guanto TDO. A indução por IFN-γ mostrou que essa citocina não só atua na formação da via QUIN, mas possui um impacto modesto nas demais rotas. Observamos também que a inibição do 1-MT mostrou seu impacto nos metabólitos involvidualmente, do que a simples relação Trp-QUIN. Contudo, nosso resultados nos permitiu mostrar pela primeira vez a descrição completa dessas vias, em especial nessas linhagens celulares, podendo supor estratégias terapêuticas nessas rotas que estão relacionadas a progressão ou não tumoral.

Palavras-chaves: triptofano, gliomas, HPLC, IDO, TDO

ABSTRACT

JÚLIO, A. R. Development and validation of bioanalytical methods for monitoring the product of the metabolic pathways of tryptophan in human glioma cell line. 2015. 203f. (Doctoral Thesis). Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2015.

The tryptophan metabolism (Trp) takes place by means of kynurenine (QUIN), by the serotonin pathway (SER) and by the pathway of trace amines synthesis. The first generates QUIN and a variety of other secondary metabolites. When driven by the enzyme indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) contributes to the phenomena of tolerance and immune escape of tumor cells; and when conducted by tryptophan 2,3 -dioxygenase (TDO) in the liver, participates in the niacin synthesis NAD. The SER pathway leads to the serotonin neurotransmitter (SER) formation, which can generate the hormone melatonin (MEL), respectively and other biologically active metabolites. Another less studied amines trace synthesis pathway produces neuroactive products. Given the scope and importance of Trp metabolic pathways, we developed and validated a robust, sensitive and selective bioanalytical method by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled mass spectrometry (MS) for simultaneous determination of TRP and its 16 metabolites. Therefore, we chose to evaluate the three routes, glioma cell lines. The initial choice of this type of cell was due to the great interest in Trp metabolism studies in tumor cells, which glioma cells has been a model. In assays with glioma cells, we followed the effects of an inductor and inhibitors of the first stage of Trp metabolism, via the kynurenine pathway, or IFN -y (IDO inducer) 1- methyltryptophane (1- MT; competitive IDO inhibitor) and 680C91 (selective TDO inhibitor). We could observe the first step induction or inhibition impact had over the further metabolites and the metabolism differences between the two studied strains, A172 and T98G. The T98G glioma cell has only IDO activity, while the A172 has both IDO and TDO activity as well. The IFN- γ indution showed that this cytokine not only acts in the formation of QUIN route, but has a modest impact on the others routes. Inhibition of IDO showed that the competitive inhibitor has activity in itself than a simple Trp-QUIN relationship. However, our results allow us to show the first time the complete description of these pathways, in particular, in these cell lines that can assume therapeutic strategies in these routes that are related or not with tumor progression.

Keywords: tryprophan, gliomas, HPLC, IDO, TDO

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo de Trp pela via das quinureninas (via QUIN)
Figura 2 - Metabolismo do Trp pela via serotoninérgica (via SER)
Figura 3 - Metabolismo do Trp pela via das aminas traço
Figura 4 - Estudos Clínicos com 1-MT. Todos os estudos utilizam a forma 1-D-MT. Retirado de
http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=methyl+tryptophan em 20/Novembro/201525
Figura 5 - Espectro de fragmentação do ácido nicotínico (Tr 3,813 min), [M+H]+ 124 m/z, ESI-
QqQ em modo positivo de ionização52
Figura 6 - Espectro de fragmentação do ácido quinolínico (Tr 4,101 min), [M+H]+ 168 m/z, ESI-
QqQ em modo positivo de ionização52
Figura 7 - Espectro de fragmentação da serotonina (Tr 5,664 min), [M+H]+ 177 m/z, ESI-QqQ
em modo positivo de ionização53
Figura 8 - Espectro de fragmentação da quinurenina (Tr 6,031 min), [M+H]+ 209 m/z,ESI-QqQ
em modo positivo de ionização53
Figura 9 - Espectro de fragmentação da quinuramina (Tr 6,245 min), [M+H]+ 165 m/z, ESI-QqQ
em modo positivo de ionização54
Figura 10 Espectro de fragmentação do triptofano-D5 (Tr 6,770 min), [M+H]+ 210 m/z,ESI-
QqQ em modo positivo de ionização54
Figura 11 - Espectro de fragmentação do ácido xanturênico (Tr 6,997 min), [M+H]+ 206 m/z, ESI-
QqQ em modo positivo de ionização55
Figura 12 - Espectro de fragmentação da triptamina (Tr 7,186 min), [M+H]+ 161 m/z,ESI-QqQ
em modo positivo de ionização55
Figura 13 - Espectro de fragmentação do ácido quinurênico (Tr 7,1371 min), [M+H]+ 190
<i>m</i> /z,ESI-QqQ em modo positivo de ionização
Figura 14 - Espectro de fragmentação da dimetiltriptamina (Tr 7,532 min), [M+H]+ 189 m/z, ESI-
QqQ em modo positivo de ionização56
Figura 15 - Espectro de fragmentação do ácido-5-hidróxiindolacético (Tr 7,822 min), [M+H]+
192 <i>m/z</i> ,ESI-QqQ em modo positivo de ionização57
Figura 16 - Espectro de fragmentação do AMK (Tr 8,667 min), [M+H]+ 237 m/z,ESI-QqQ em
modo positivo de ionização57

Figura 17 - Espectro de fragmentação do AFMK (Tr 8,920min), [M+H]+ 265 m/z,ESI-QqQ em Figura 18 -Espectro de fragmentação do ácido indolacético (Tr 10,127min), [M+H]+ 176 Figura 19 - Espectro de fragmentação da melatonina (Tr 9,868 min), [M+H]+ 233 m/z,ESI-QqQ Figura 20 - Espectro de fragmentação do ácido antranílico (Tr 9,013 min), [M+H]+ 138 m/z, ESI-Figura 21 - (A) Cromatograma do LSQ (limite superir de guantuficação- 50 mmol.L⁻¹); (B) Figura 23 - No painel, são descritas as alterações nas vias de degradação do Trp nas células A172 (A) e T98G (B) tratadas com IFN-γ. ND: não detectável; (*) P<0,01; (**) P<0,005; (***) Figura 24 - Efeito da adição de 1-DL-MT (1 mmoles.L-1), em gliomas A172 (A) e T98G (B)..77 Figura 25 - No painel, são descritas as alterações nas vias de degradação do Trp nas células A172 (A) e T98G (B) tratadas com 1-MT. ND: não detectável; (*) P<0,05; (**) P<0,001; (***) Figura 26 - Efeito da adição de 680C91 (20 µmoles.L-1), em gliomas A172 (A) e T98G (B)..80 Figure 27 - No painel, são descritas as alterações nas vias de degradação do Trp nas células A172 (A) e T98G (B) tratadas com 680C91. ND: não detectável; (*) P<0,05; (**) P<0,001; (***)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo dos principais métodos cromatográficos por HPLC para determinação do
triptofano e seus metabólitos em diferentes amostras29
Tabela 2 - Parâmetros de otimização dos analitos de interesse 39
Tabela 3 - Condições cromatográficas do método para determinação do Trp e seus metabólitos
Tabela 4 - Principais características físico-químicas dos metabólitos do TRP48
Tabela 5 - Seletividade 60
Tabela 6 - Parâmetros de linearidade65
Tabela 7 - Resultados de precisão e exatidão para o triptofano e seus metabólitos
Tabela 8 - Recuperação e efeito matriz 69

LISTA DE SIGLAS

- 1-MT 1-metil-triptofano
- 3-HAA 3-hidróxi-antranílico
- 3-HK 3-hidróxi-quinurenina
- 5-HIAA 5-hidróxi-ácido-indol-acético
- 5-OH-QUIM 5-hidróxi-quinuramina
- 5-OH-QUIN 5-hidróxi-quinurenina
- 5-OH-TRP 5-hidróxi-triptofano
- AA Ácido antranílico
- ACN Acetonitrila
- AFMK N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina
- AHR Receptor humano aril hidrocarboneto aromático
- AMK N1-acetil-5-metoxiquinuramina
- DAD Detector de arranjo de diodo
- DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMFK N,N-dimetilformiquinurenina
- DMK N, N-dimetilquinurenina
- DMT N,N-dimetiltriptamina
- DMT-OH DMT-hidroxilada
- ESI eletrospray
- HPLC Cromatografia líquida de alta eficiência
- IAA Ácido indol acético
- IDO Indolamina-2,3-dioxigenase
- KA Ácido quinurênico

- LLE Extração líquido-líquido
- MEL Melatonina
- MEL-D7 Melatonina-D7
- MeOH Metanol
- MMT N-dimetiltriptamina
- MRM Multiple Reaction Monitoring
- NA Ácido nicotínico
- NAD Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- Nam Ácido nicotínico mononucleotídeo
- PA Ácido picolínico
- QA Ácido quinolínico
- QUIM Quinuramina
- QUIN Quinurenina
- SER Serotonina
- SPE Extração em fase sólida
- TDO Triptofano-2,3-dioxigenase
- TME Triptofano metil ester
- TRP Triptofano
- TRY Triptamina
- XA Ácido xanturênico

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. METABOLISMO DO TRIPTOFANO	
1.2. METABOLISMO DO TRIPTOFANO NO CÂNCER	
1.3. METABOLISMO DO TRIPTOFANO EM GLIOMAS	
1.4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS PARA A	DETERMINAÇÃO
DO METABOLISMO DO TRIPTOFANO E SEUS METABOLITOS	
	35
2.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS	
3. MATERIAIS E METODOS	36
3.1. SOLVENTES E REAGENTES	
3.2. PREPARO DOS PADROES	
3.3. INSTRUMENTAÇÃO	
3.4. OTIMIZAÇÃO DO METODO POR ESI-LC-MS/MS	
3.5.EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS	
3.6. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA	
3.6.1. SELETIVIDADE E EFEITO RESIDUAL	
3.6.2. LINEARIDADE, LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE INFERIOR DE QUANTIFICAÇÃO	43
3.6.3. PRECISÃO E EXATIDÃO	
3.6.4. RECUPERAÇÃO E EFEITO MATRIZ	
3.7. DETERMINAÇÃO DOS METABÓLITOS DO Trp EM LINHAGENHS HUMANO	DE GLIOMA 46
3.7.1. CONDIÇÕES DE CUI TURAS CELUI ARES	46
3.7.2 PREPARO DA AMOSTRA	46
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
CAPÍTULO 1. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANA	ALÍTICO 48
4.1. ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS DOS COMPOSTOS	
4.2. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO POR LC-MS	51
4.3. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA	
4.3.1. SELETIVIDADE E EFEITO RESIDUAL	
4.3.2. LINEARIDADE	

4.3.3. PRECISÃO E EXATIDÃO	66
4.3.4. RECUPERAÇÃO E EFEITO MATRIZ	68
CAPÍTULO 2. ESTUDO DO METABOLISMO DE Trp EM LINHAGENS TUMORAIS DE GLIOMA HUMANO70	
4.4. DETERMINAÇÃO DOS METABÓLITOS DO Trp EM CÉLULAS DE GLIOMA HUM	ANO 70
5. CONCLUSÕES	
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS83	
7. MATERIAL SUPLEMENTAR	
7.1. Curvas em solvente do teste de seletividade	92
7.2. Curvas em matriz do teste de seletividade	. 139
7.3. Gráficos com valores de p para A172 e T98G (IFN- γ , 1-DL-MT e 680C91)	. 184
8. ADENDO	

1. INTRODUÇÃO

1.1. METABOLISMO DO TRIPTOFANO

O aminoácido essencial triptofano (TRP) desempenha um papel importante para a biossíntese de proteínas, além de ser precursor de vários compostos biologicamente ativos, tais como: *L*-quinurenina (QUIN), serotonina (SER), entre outros (1,2). O TRP é metabolizado principalmente por duas vias bioquímicas: (i) via das quinureninas (via QUIN) e (ii) via serotoninérgica (via SER) (3) e uma terceira menos estudada que é a via das asminas traço.

A via QUIN inicia-se pela ação da enzima triptofano-2,3-dioxigenase (TDO), localizada predominantemente no fígado, e mais recentemente encontrada em células de glioma humano (4), como pela enzima indolamina-2,3-dioxigenase (5) (IDO1), que é expressa em vários tecidos além de células do sistema imune (6,7) e pela IDO2, a qual não é tão expressa como a IDO1, mas também é expressa nas células dendríticas, onde o catabolismo do TRP leva a imunotolerância (22). A IDO e TDO são as enzimas que catalisam o primeiro passo do catabolismo do TRP, como no caso da via QUIN, onde o TRP é oxidado a N-formil-quinurenina (NFK), seguida de uma deformilação, gerando o metabólito QUIN, que posteriormente gera ácido quinurênico (KA), via ação da enzima quinurenina aminotransferase (KAT), sendo este metabólito um antagonista endógeno do N-metil-D-aspartato (NMDA) (8), além disso, QUIN pode ser substrato das enzimas: quinureninase, que gera ácido antranílico (AA); quinurenina monoxigenase, produzindo 3-hidróxi-quinurenina (3-HK); transaminase, onde o 3-hidróxiquinurenina gera ácido xanturênico (XA); ácido 3-hidróxi-antranílico oxigenase que catalisa a conversão de ácido 3-hidróxi-antranílico (3-HAA) a ácido quinolínico (QA), o qual está envolvido em diversas patologias, principalmente doenças neurológicas (9). O ácido quinolínico por sua vez é catalisado por uma fosforibosil-transferase a ácido nicotínico (NA) ou ácido nicotínico mononucleotídeo (NAm), que é posteriormente utilizado para a síntese de

17

nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) (10) pela via conhecida como síntese "de novo", no fígado. Por fim, 3-HAA ainda é direcionado a produção de ácido picolínico (PA) por uma descarboxilase e pode também ser substrato de uma descarboxilase que gera quinuramina (QUIM), em uma reação que ocorre principalmente no fígado (Figura 1).



Figura 1 - Metabolismo de Trp pela via das quinureninas (via QUIN)

Em condições normais, a concentração de QUIN é relacionada à concentração de TRP. A redução da ingestão de TRP gera diminuição das concentrações de QUIN (3). O catabolismo do TRP acontece em várias células em diferentes organismos, incluindo células apresentadoras de antígenos como macrófagos, células dendríticas, fibroblastos e também em tecidos humanos (4). A relação entre a concentração do primeiro produto formado pela enzima TDO ou

IDO *versus* a concentração de seu substrato é um indicador apropriado da degradação do TRP e fornece uma medida importante para determinar algumas alterações celulares. Aliás, a sua

depleção é considerada como um mecanismo de defesa induzida por IFN-γ em células imunocompetentes durante a resposta imune. Este fenômeno age como um mecanismo antimicrobiano ou antitumoral e limita o crescimento de patógenos intracelulares ou células malignas, como no caso de pacientes com tumores, onde tem sido afirmado que a degradação do TRP pode representar um mecanismo de imuno escape intrínseco das células tumorais (4).

Uma via alternativa a via QUIN é a via SER (Figura 2). Em condições normais do organismo, apenas 2% do TRP que é ingerido é direcionado a via SER onde somente 10 mg de SER é sintetizada diariamente no nosso organismo (11). A serotonina pode ser metabolizada através de desaminação oxidativa (monoamina oxidase, MAO), conjugação com os ácidos sulfônico e glucurônico, N-acetilação, 5-O- metilação e outras combinações (11). Nesta via, há a conversão do TRP em serotonina (SER), onde 5-hidróxi-triptofano (5-OH-TRP) é o intermediário para essa conversão. 5-OH-TRP é posteriormente descarboxilado a 5-hidróxi-triptamina (serotonina, SER) pela enzima descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos que utiliza vitamina B6 como cofator da reação (12). Tanto 5-OH-TRP como a SER podem sofrer ação da IDO e serem convertidos a 5-hidróxi-quinurenina (5-OH-QUIN) e 5-hidróxi-quinuramina (5-OH-QUIM), respectivamente. A SER quando metabolizada pela MAO, forma o metabólito 5-hidróxi-indolacetaldeído, que é oxidado ao ácido 5-hidróxi-indol-acético (5-HIAA), em reação catalisada pela aldeído desidrogenase que utiliza NAD como coenzima. Na sequência, o 5-HIAA pode ser reduzido a 5-hidróxi-triptofol, em redução catalisada pela aldeído redutase que utiliza NADH como coenzima (11). Consecutivamente, duas enzimas altamente específicas que catalisam subsequentemente a N-acetilação e 5-O-metilação da SER estão envolvidos na síntese de melatonina (MEL), sintetizada, principalmente, na glândula pineal. Sua produção se dá numa rota intermediada pela N-acetilserotonina envolvendo duas enzimas: N-acetiltransferase

(AANAT) e o hidroxi-indol-*O*-metiltransferase (HIOMT) (13). Devido a essas reações, os grupos hidroxila e amina da SER são bloqueados o que torna o metabólito MEL altamente hidrofóbico (14).



Figura 2 - Metabolismo do Trp pela via serotoninérgica (via SER).

A MEL é um importante mediador das interações neuroimune, atuando em receptores de membrana, modulando a proliferação de linfócitos T, a geração de citocinas e fator de crescimento. A MEL gera metabólitos de abertura do anel indólico, que, quando oxidada, gera a N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxiquinuramina (AFMK). Existem rotas não enzimáticas de formação de AFMK (87) e rotas enzimáticas catalisadas por peroxidases, como a mieloperoxidase (MPO), que está presente em células do sistema imune. Em seguida, uma deformilação gera a N^1 -acetil-5-metoxiquinuramina (AMK) (Figura 2) (15). A atividade biológica desses metabólitos de abertura do anel indólico permanece desconhecida, porém é conhecida sua capacidade antioxidante, a qual foi avaliada pela sua capacidade de doar elétrons e proteger macromoléculas do estresse oxidativo (16).

Outros produtos resultantes do catabolismo endógeno do TRP são as triptaminas. Na síntese da via das aminas traço, primeiramente o TRP sofre uma descarboxilação catalisada pela enzima aminoácido aromático descarboxilase, formando a triptamina (TRY). Em seguida, a TRY é monometilada a partir da ação da enzima indol-amina-*N*-metil-transferase (INMT), onde o grupamento metil é proveniente do *S*-adenosil-metionina (SAM), formando assim a *N*-metiltriptamina (MMT). Novamente, um segundo grupamento metil é inserido na molécula formando a DMT. Ainda, no catabolismo da TRY pode ocorrer a formação do ácido-3-indol acético (IAA), o qual produz espécies reativas de oxigênio (ROS) e vários radicais livres quando oxidados por peroxidases (17). Por fim, o grupo colaborador deste trabalho demonstrou que a DMT também pode ser degradado por peroxidases gerando um produto hidroxilado (DMT-OH) e os produtos de abertura de anel indólico, análogos da QUIN, *N*,*N*-dimetilformiquinurenina (DMK) (Figura 3) (88).



Figura 3 - Metabolismo do Trp pela via das aminas traço.

1.2. METABOLISMO DO TRIPTOFANO NO CÂNCER

As moléculas originadas no catabolismo do TRP participam da inflamação e controle da ativação de células T, onde regulam sua ativação, proliferação e apoptose (18). Nos processos patológicos, ele participa das doenças autoimunes, Alzheimer, esclerose aminotrófica lateral, Huntington, AIDS, demência, malária, câncer, depressão e esquizofrenia (19). Dessa forma, há um interesse contínuo e crescente no estudo do catabolismo do triptofano e a repercussão deste sobre inúmeros processos fisiológicos, tais como a tolerância e imunomodulação e patológicos como o imuno escape e proliferação de tumores (20).

Como citado anteriormente, o TRP é oxidado pela clivagem do anel indólico, iniciado tanto pela TDO, IDO-1 ou também pela indolamina 2,3-dioxigenase 2 (IDO-2) (21, 22). A TDO reside primariamente no fígado e é induzido pelo TRP ou corticoides. No cérebro, a TDO regula a

produção de metabólitos neuroativos, como KA e QA (19). Dois estudos recentes, apontam a importância de TDO em determinados tipos de canceres, principalmente em glioma, carcinoma hepatocelular, melanoma e câncer da bexiga (4, 23). IDO-1, por outro lado, é a enzima extra hepática predominante e pode ser encontrada em diversas células, incluindo macrófagos, microglia, neurônios e astrócitos (24). Sua expressão é induzida por citocinas e moléculas inflamatórias, como lipopolissacarídeos, peptídeos amilóides, mas o seu indutor mais potente é o IFN-γ (21,25). Durante uma resposta imune, a liberação de IFN-γ pela ativação de células T e leucócitos leva a uma degradação acelerada do TRP. A significância desse fenômeno biológico foi especulada inicialmente como um mecanismo de defesa que mata as células do tumor, ou patógenos, impedindo-os de consumir TRP do meio (19). Além disso, algumas quinureninas, como QA e 3-HAA, podem suprimir efetivamente a proliferação de células T (26). Recentemente, IDO-2, foi identificada como uma enzima que possui uma expressão e regulação molecular diferente da IDO-1. Os genes que codificam IDO-1 e IDO-2 estão localizados próximos um ao outro e a IDO-2 possui estrutura e atividade enzimática similar a IDO-1. No entanto, a sua relevância fisiológica permanece incerta, pois sua atividade é muito baixa e a presença de polimorfismos pode gerar a enzima em sua forma inativa (18).

Como as dioxigenases são o passo limitante para o catabolismo de TPR, a IDO tem sido um foco do segmento farmacêutico para o desenvolvimento de novos medicamentos. O inibidor da enzima IDO, 1-metil-triptofano (1-MT), vem sendo utilizado em estudos clínicos como coadjuvante para quimioterapia (Figura 4).

Rank	Status	Study
1	Not yet	C11 AMT Positron Emission Tomography (PET) Imaging in Patients With Metastatic Invasive Breast Cancer
	recruiting	Condition: Breast Cancer
		Interventions: Biological: Adenovirus-p53 transduced dendritic cell vaccine; Drug: 1-methyl-
		D-tryptophan; Radiation: Carbon C 11 alpha-methyltryptophan
2	Recruiting	1-Methyl-D-Tryptophan in Treating Patients With Metastatic or Refractory Solid Tumors That Cannot Be
		Removed By Surgery
		Condition: Unspecified Adult Solid Tumor, Protocol Specific
		Interventions: Drug: 1-methyl-d-tryptophan; Other: pharmacological study;
		Other: high performance liquid chromatography; Other: laboratory biomarker analysis;
		Genetic: polymorphism analysis; Genetic: DNA analysis
3	Recruiting	1-Methyl-D-Tryptophan and Docetaxel in Treating Patients With Metastatic Solid Tumors
		Condition: Unspecified Adult Solid Tumor, Protocol Specific
		Interventions: Drug: 1-methyl-d-tryptophan; Drug: docetaxel;
		Other: diagnostic laboratory biomarker analysis; Other: pharmacological study
4	Recruiting	Study of Ad.p53 DC Vaccine and 1-MTin Metastatic Invasive Breast Cancer
		Condition: Breast Cancer
		Interventions: Biological: Ad.p53 DC vaccine; Drug: 1-methyl-D-tryptophan (1-MT)
5	Terminated	IDO Inhibitor Study for Relapsed or Refractory Solid Tumors
		Conditions: Breast Cancer; Lung Cancer; Melanoma; Pancreatic Cancer; Solid Tumors
		Intervention: Drug: 1-methyl-D-tryptophan
6	Recruiting	Phase II Study of Sipuleucel-T and Indoximod for Patients With Refractory Metastatic Prostate Cancer
	-	Condition: Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer
		Interventions: Biological: Indoximod; Biological: Sipuleucel-T; Other: Placebo

Figura 4 - Estudos Clínicos com 1-MT. Todos os estudos utilizam a forma 1-D-MT. Retirado de http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=methyl+tryptophan em 20/Novembro/2015.

Para a TDO, a busca de inibidores apenas começou com a descoberta de sua importância na biologia do câncer, que foi recente (2011). Estudos pré-clínicos, indicaram que a inibição de TDO com uso de medicamentos orais não resultaram toxicidade, especialmente no tecido hepático. Porém, a inibição de TDO com inibidores permeáveis a barreira hematoencefálica podem conduzir a efeitos secundários no sistema nervoso (18).

Conforme apresentado, a via das quinureninas tem sido envolvida em uma variedade de doenças. Os metabólitos 3-HAA, QUIN, KA e 3-HK suprimem a função de células T e são capazes de induzir apoptose das mesmas. 3-HAA tem como função gerar radicais livres, QA é um agonista do receptor NMDA, KA é antagonista do NMDA e PA é um neuroprotetor. A via SER, também tem sido apontada como forte atuante em processos tumorais e na resposta imunológica. O aumento pronunciado na produção de SER e seu metabólito 5-HIAA são encontrados principalmente em tumores carcinóides (27). Em sequência, pela via

serotoninérgica, estudos mostraram em pacientes com câncer de mama e de próstata, que as concentrações séricas de MEL são mais baixos quando comparados com indivíduos da mesma idade sem tumores malignos. Já em estudos em culturas celulares, foi investigado, que, a MEL inibe diretamente o crescimento celular ou induz a apoptose (28,40).

Trabalhos do grupo demonstraram que AFMK e AMK mantêm as atividades biológicas reconhecidas para a MEL 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 MEL, sugerindo que a metabolização da MEL à AFMK em sítios inflamatórios teria um forte papel imunomodulatório (29-31).

As funções até agora descritas para o DMT são poucas e estão principalmente associadas ao sistema nervoso (32, 33). O grupo colaborador vem endereçando estudos nesta direção (88).

1.3. METABOLISMO DO TRIPTOFANO EM GLIOMAS

Os tumores cerebrais malignos constituem uma pequena porcentagem de todos os tumores de adultos, uma taxa de 4-5 em 100 mil adultos por ano. A sua natureza maligna os torna a quarta maior causa de morte (34). Os tumores da glia são originados a partir de células da neuroglia transformadas. A neuroglia é formada por quatro tipos de células: astrócitos, oligodendrócitos, ependimócitos e microglia (34).

Segundo o sistema de classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), os tumores de cérebro são classificados de acordo com suas características histológicas, onde: (i) grau I é denominado astrocitoma pilocítico; (ii) astrocitoma difuso (grau II); astrocitoma anaplásico (grau II) e glioblastoma multiforme (grau IV). O glioblastoma multiforme (GBM), que representa o mais maligno dos tumores cerebrais primários é heterogêneo e é caracterizado por taxas elevadas de proliferação, hiperplasia, áreas necróticas e formação de vasos sanguíneos (34).

Apesar do tratamento agressivo (ressecção combinada com radioterapia e quimioterapia) o tempo médio de sobrevida para os pacientes com GBM ainda é de 12 a 14 meses (34). A causa dos gliomas ainda não é bem compreendida, porém, estudos indicam que o ambiente cerebral é suscetível ao estresse oxidativo e peroxidação lipídica, em razão da grande quantidade de ácidos graxos oxidados, ao elevado consumo de oxigênio e ao pequeno número de enzimas antioxidantes. Portanto, abranger os fatores que estimulam o fenótipo agressivo destes tumores é de extrema importância para a geração de novos alvos terapêuticos.

O metabolismo de TRP no microambiente do glioma é mediado pela expressão da IDO e TDO nas células tumorais, infiltrados de monócitos, microglia, células endoteliais e neurônios. Um estudo mostrou a capacidade dos gliomas de usar QA como precursor de NAD, enquanto astrócitos não neoplásicos usam o NA (35). Já na via SER, outro estudo mostrou que a melatonina reduz o crescimento celular e inibe a progressão celular da fase G1 para S no ciclo celular (36). Os efeitos da MEL na migração e invasão celular nos gliomas ainda são pouco elucidados. Em relação a via de síntese da DMT, Tourino e colaboradores (89) observaram, que TRY e DMT modulam a atividade da IDO humana recombinante, como inibidores não competitivos no glioma A172, entretanto não há relatos na literatura de seus metabólitos atuando nas células dos gliomas humanos.

Nove entre 10 biópsias de glioblastoma humano e linhagens celulares de tumores do cérebro tem mostrado a expressão constitutiva da IDO-1. Sabe-se que a expressão e atividade de IDO-1 em linhagens de células gliais e de glioma humano é aumentada por IFN-γ (90). Miyazaki e colaboradores mostraram que em várias linhagens de glioma humano a exposição a IFN-γ diminuiu significativamente as concentrações de TRP no meio de cultura. Eles também demonstraram que o inibidor da IDO (1-MT) previne a depleção de TRP (37). Opitz e colaboradores mostraram que não só a IDO, mas também a TDO, são frequentemente expressas e ativadas em gliomas. Eles identificaram que QUIN é um ligante endógeno do

receptor humano aril hidrocarboneto aromático (AHR), e a partir da sua ligação a esse receptor, promove o aumento da motilidade, imuno escape, atividade clonogênica e sobrevivência tumoral (4). Estes resultados sugerem que a via de sinalização TDO-QUIN-AHR pode modular a inflamação e imunidade e representar um novo alvo terapêutico na terapia do câncer.

Como a IDO tem sido o foco do desenvolvimento de novos medicamentos, principalmente no câncer, com o objetivo de reforçar a imunidade antitumoral, a recente descoberta de TDO como uma dioxigenase alternativa de moldar a imunobiologia do câncer, particularmente em gliomas, provocou a busca por inibidores de TDO. Um dos inibidores conhecido é o 3-(2-(piridil)etinil)indol (680C91). Outro composto, denominado LM10, apresentou atividade imunoestimulante em modelos pré-clínicos em câncer, aumentando assim, a eficácia das vacinas terapêuticas (38,39).

A interrelação entre as vias metabólicas é de profunda importância farmacológica e fisiológica, já que atuando sobre uma via pode-se impactar sobre as outras (40). A diferente resposta antitumoral de inibidores e a variabilidade das mutações nas linhagens celulares, faz com que o estudo do metabolismo do TRP nessas células se torne uma ferramenta indispensável para o estudo de tumores. Dessa forma, se faz necessário o desenvolvimento de uma metodologia bioanalítica sensível, robusta e adequada para acompanhar a formação desses produtos e buscar respostas no que se diz respeito a diagnóstico e prognóstico dessa doença.

1.4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DO METABOLISMO DO TRIPTOFANO E SEUS METABÓLITOS

Várias metodologias para a detecção e quantificação do TRP e seus metabólitos são descritas na literatura, com o predomínio principal da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a diferentes tipos de detectores (2,3,5,8,41-51). Atualmente, com a chegada do HPLC acoplado a ionização por *electrospray* (ESI) e a detecção por espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS), uma ferramenta seletiva, robusta e sensível para rastrear a análise de vários compostos em diversas matrizes, novos papéis fisiológicos e correlações entre as diferentes vias metabólicas podem ser relatados através da detecção simultânea dos mesmos.

Com isso, a Tabela 1 apresenta um resumo dos trabalhos mais citados na literatura que determinaram alguns dos metabólitos do TRP.

Tabela 1 - Resumo dos principais métodos cromatográficos por HPLC para determinação do triptofano e seus metabólitos em diferentes amostras.

Citações	Método	Extração/Amostra	Detecção	Metabólitos	Referências	Ano
253	Coluna: LiChroCART RP18 <u>FM:</u> Tampão fosfato (pH 6,4):Acetonitrila <u>Tempo:</u> 40 min <u>Vol. Injeção:</u> Não especificado <u>Vazão:</u> 0,8 mL.min ⁻¹ Amostra: Soro	Precipitação de Proteínaem soro	Fluorescência (FD) para TRP (excitação 285 e emissão 365 nm) e Ultravioleta (UV) para QUIN (360 nm)	TRP e QUIN	WIDNER, B., et. al. (52)	1997
148	<u>Coluna:</u> Vydac 201 TP- RP (250 x 3.2 mm, 10 μm) <u>FM:</u> Ácido acético :Metanol <u>Tempo:</u> 20 min <u>Vol. Injeção:</u> Não especificado <u>Vazão:</u> 0,7 mL.min ⁻¹ Amostra: Cérebro de rato	Precipitação de Proteína em tecido pineal de rato	HPLC- Eletroquímica (Ag/AgCl)	SER, TRP, 5-HIAA e MEL	MEFFORD, I., et. al. (53)	1980

114	<u>Coluna:</u> 100 x 4.7 mm empacotado com Partisphere 5 μm C18 <u>FM:</u> Tampão fosfato (pH 6,4):Acetonitrila <u>Tempo:</u> 40 min <u>Vol. Injeção:</u> 100 μL <u>Vazão:</u> 1 mL.min ⁻¹ Amostra: Soro	Precipitação de Proteína em soro	FD para TRP (excitação 320, 254 e emissão 420, 404 nm) e UV para QUIN (230 3 365 nm)	TRP, QUIN, 3-HK e KA	HERVÉ, C., et. al. (54)	1996
112	<u>Coluna:</u> LiChroCART RP18 <u>FM:</u> Acetato de sódio- ácido acético (pH4): Acetonitrila <u>Tempo:</u> 7 min <u>Vol. Injeção:</u> Não Especificado <u>Vazão:</u> 0,9 mL.min ⁻¹ Amostra: soro	Precipitação de Proteína em soro	FD para TRP (excitação 286 e emissão 366 nm) e UV para QUIN (360 nm)	TRP e QUIN	LAICH et. al. (55)	2002
112	<u>Coluna:</u> Ultrasphere ODS <u>FM:</u> Acetato de amônio (pH 4,65): Acetonitrila <u>Tempo:</u> 7 min <u>Vol. Injeção:</u> 50 μL <u>Vazão:</u> 1,5 mL.min ⁻¹ Amostra: soro	Precipitação de Proteína em soro	UV (365 nm)	QUIN	HOLMES (56)	1988
83	<u>Coluna:</u> Inertsil ODS-3 (250 x 3.0 mm, 5 μm) <u>FM:</u> 50 mmol.L ⁻¹ fosfato de potássio dihidrogenado (pH 3,3): Acetonitrila <u>Tempo:</u> 20 min. <u>Vol. Injeção:</u> 20 μL <u>Vazão:</u> 0,6 mL.min ⁻¹ Amostra: plasma	Extração em fase sólida (SPE) em plasma	FD (excitação 285 nm e emissão 340 nm)	TRP, 5- HIAA, SER, 5-HTP	KEMA, I. P., et. al. (27)	2001
71	<u>Coluna:</u> Nucleosil ODS (100 x 2.0 mm, 5 μm) <u>FM:</u> Metanol:0.1 % ácido fórmico (v/v) <u>Tempo:</u> 21 min. <u>Vol. Injeção:</u> 20 μL <u>Vazão:</u> 0,3 mL.min ⁻¹ <u>Amostra:</u> extrato de planta	Centrifugação em extrato de planta	ESI-LC-MS/MS	IAA	DURGBANSHI , A., et. al. (57)	2005
71	<u>Coluna:</u> C18 Nova-pak (100 x 5 mm, 4 μm) <u>FM:</u> Tampão fosfato (0.01 M; pH 7.2): Acetonitrila <u>Tempo:</u> 30 min <u>Vol.</u> <u>Injeção:</u> Não especificado <u>Vazão:</u> 1 mL.min ⁻¹ Amostra: Queratinócito	Extração Líquido- Líquido (LLE) em queratinócitos	UV (275 nm)	AFMK	FISCHER, T. W., et. al. (58)	2006
57	<u>Coluna:</u> μBondapak (30 cm x 3.9) <u>FM:</u> Tampão fosfato (0.001 M; pH 4): Metanol (75:25) <u>Tempo:</u> 25 min <u>Vol. Injeção:</u> 25 μL <u>Vazão:</u> 1,8 mL.min ⁻¹ Amostra: não consta	Não Consta	UV (254 nm)	3-HK, QUIN, NFK, TRP, IAA e TRY	YONG, S., et. al. (59)	1979

53	<u>Coluna:</u> Coluna Capilar (150 x 0.5 mm, 3 μm C18) <u>FM:</u> 2.1 %ácido fórmico (pH2): Acetonitrila 0.1 % ácido fórmico. <u>Tempo:</u> 11 min <u>Vol.</u> <u>Injeção:</u> 7 μL <u>Vazão:</u> 0,012 mL.min ⁻¹ Amostra: Plasma	Precipitação de Proteína em plasma	ESI-LC-MS/MS	TRP, QUIN e KA	AMIRKHANI, A., et. al. (60)	2002
43	<u>Coluna:</u> Zorbax C8 (150 x 4.6 mm, 3.5 μm) <u>FM:</u> 650 mmol.L ⁻¹ ácido acético/100mmo.L ⁻¹ HFBA/90% Acetonitrila <u>Tempo:</u> 5 min <u>Vol.</u> <u>Injeção</u> : 50 μL <u>Vazão:</u> 1,3 mL.min ⁻¹ Amostra: plasma	Precipitação de proteína em plasma	ESI-LC-MS/MS	3-HK, TRP QUIN, KA, AA, XA E 3- HAA	MIDTTUN, et. al. (61)	2009
40	<u>Coluna:</u> Atlantis C18 (100 x 2.1 mm, 3 μm) <u>FM:</u> 0,2% ácido fórmico: Acetonitrla <u>Tempo:</u> não especificado <u>Vol. Injeção</u> : 50 μL <u>Vazão:</u> 0,3 mL.min ⁻¹ Amostra: plasma	SPE em plasma	ESI-LC-MS/MS	3-HK, TRP QUIN	de JONG, W. H. A., et. al. (26)	2009
38	<u>Coluna:</u> C8 Symmetry (100 x 3.9 mm) <u>FM:</u> 0,1% ácido fórmico: Metanol <u>Tempo:</u> 6 min <u>Vol. Injeção</u> : 100 μL <u>Vazão:</u> 0,8 mL.min ⁻¹ Amostra: saliva	SPE em saliva	ESI-LC-MS/MS	MEL	ERIKSSON, et. al. (62)	2003
37	<u>Coluna:</u> Xterra C18 (1000 x 2.1 mm, 3.5 μm) <u>FM:</u> 0.45 % ádico fórmico: Acetonitrila <u>Tempo:</u> 16 min <u>Vol. Injeção</u> : 50 μL <u>Vazão:</u> 0,25 mL.min ⁻¹ Amostra: planta	Sonicação em plantas	ESI/APPI/APCI- LC-MS/MS	SER, IAA e MEL	CAO, J. et. al. (63)	2006
36	<u>Coluna:</u> ODS (40 x 4 mm, 7 μm) <u>FM:</u> Tampão fosfato (0.1 M, pH 2): Acetonitrila <u>Tempo:</u> 40 min <u>Vol.</u> <u>Injeção</u> : 100 μL <u>Vazão:</u> 1,3 mL.min ⁻¹ Amostra: plasma e soro	SPE plasma e soro	FD e Eletroquímico	SER, TRP, 5-HIAA, IAA, 3-HK, QUIN, XA, KA, QA e AA	MORITA, I. (64)	1990
30	<u>Coluna:</u> Atlantis C18 (150 x 2.1 mm, 3 μm) <u>FM:</u> 5mmoles.L ⁻¹ formiato de amônio 0,01 % TFA: Metanol <u>Tempo</u> : 15 min. <u>Vol. Injeção</u> : 10 μL <u>Vazão:</u> 0,15 mL.min ⁻¹ Amostra: glioma LN229	Precipitação de Proteína em glioma	ESI-LC-MS/MS	3HK, 3-HAA, TRP e QUIN	YAMADA, K., T., et. al. (42)	2008

28	<u>Coluna:</u> Phenomenex C18 (25 x 4.6 mm, 5 μm)" <u>FM:</u> Acetonitrila:Água (25:75) <u>Tempo:</u> 8 min. <u>Vol. Injeção:</u> 40 μL <u>Vazão:</u> 1 mL.min ⁻¹ <u>Amostra:</u> Líquido Cefalorraquidiano	LLE em fluído cerebroespinhal	FD (excitação 340 nm e emissão 460 nm) e LC-MS	AMK e AFMK	SILVA, S. O., et. al. (31)	2005
26	<u>Coluna:</u> Brownlee O Spheri-5 RP-18 (100 x 1.0 mm, 5 μm) <u>FM:</u> 0,2 % ácido fórmico:Metanol <u>Tempo:</u> 15 min <u>Vol. Injeção:</u> 10 μL <u>Vazão:</u> 40 mL.min ⁻¹ Amostra: urina	SPE em urina	ESI-LC-MS/MS	DMT	FORSSTRÖ, T., et. al. (65)	2001
24	<u>Coluna:</u> Agilent Hypersil ODS (125 × 4.0 mm, 5 μm) <u>FM:</u> 15mmoles.L ⁻¹ Tampão acetato (pH 4.0):Acetonitrila (95:5, v/v) <u>Tempo:</u> 6 min <u>Vol. Injeção:</u> 20 μL <u>Vazão:</u> 0,8 mL.min ⁻¹ Amostra: plasma	Precipitação de Proteína em plasma	UV (254 nm)	TRP e QUIN	ZHANG, X., et. al. (3)	2009
21	<u>Coluna:</u> ODS - CAPCLLE PAK C18 <u>FM:</u> Água:Metanol (95:5 v/v) 0.1 % ácido fórmico <u>Tempo:</u> 40 min. <u>Vol. Injeção:</u> 50 μL <u>Vazão:</u> 3 mL.min ⁻¹ <u>Amostra:</u> plasma de roedor	SPE em plasma de rato	Fluorescência (excitação 431 nm e emissão 533 nm)	QUIN	MITSUHASHI, S., et. al. (66)	2007
16	<u>Coluna:</u> Primesep B (3.2 X 50 mm, 5 μm) <u>FM:</u> Metanol 0.1 % ácido fórmico e 2mmol.L ⁻¹ formiato de amônio <u>Tempo:</u> 6 min. <u>Vol. Injeção:</u> 10 μL <u>Vazão:</u> 0,8 mL.min ⁻¹ Amostra: plaqueta	Precipitação de Proteína em plasma	LC-ESI-MS/MS	SER	MONAGHAN, PJ., et. al. (67)	2009
10	<u>Coluna:</u> Onyx Monolithic C18 (25 X 4.8 μm) <u>FM:</u> 10 mmol.L ⁻¹ acetato de amônio e 0.1 % ácido fórmico (v/v): Metanol 2 mmol.L ⁻¹ acetato de amônio e 0.1 % ácido fórmico (v/v) <u>Tempo:</u> 8 min. <u>Vol. Injeção:</u> 40 μL <u>Vazão:</u> 0,7 mL.min ⁻¹ Amostra: plasma	SPE em plasma	ESI-LC-MS/MS	5-HIAA	MILLER AG., et. al. (43)	2010

8	<u>Coluna</u> Zorbax Eclipse C8 (4.6 × 150 mm, 5 μm) <u>FM:</u> Água 0.1 % ácido fórmico (v/v):Acetonitrila <u>Tempo:</u> 20 min. <u>Vol. Injeção:</u> 25 μL <u>Vazão:</u> 0,2 mL.min ⁻¹ <u>Amostra:</u> lavado do intestino	Não consta	ESI-LC-MS	SER	GREGERSEN, K., et. al. (68)	2008
7	<u>Coluna:</u> Atlantis T3 (150 x 2.1 mm, 3 μm) <u>FM:</u> 0.1 % ácido fórmico em água (v/v): 0.1 % ácido fórmico em Acetonitrila (v/v) <u>Tempo:</u> 15 min <u>Vol.</u> <u>Injeção:</u> 10 μL <u>Vazão:</u> 0,4 mL.min ⁻¹ <u>Amostra:</u> urina, soro e células dendríticas	Precipitação de Proteína em soro, urina, e células dendríticas	ESI-LC-MS/MS	NA, QA, SER, QUIN, TRP, TRY, XA, KA, 5- HIAA, AA, MEL e IAA	ZHU, W., et. al. (69)	2011
0	<u>Coluna:</u> Zorbax Eclipse Plus C18 (3.0 × 100 mm, 3.5 μm) <u>FM:</u> : 0.1 % ácido fórmico em água (v/v): 0.1 % ácido fórmico em Acetonitrila (v/v) <u>Tempo:</u> 24 min <u>Vol. Injeção:</u> 30 μL <u>Vazão:</u> 300 mL.min ⁻¹ Amostra: glândula pineal	Sem extração em glândula pineal	ESI-LC-MS/MS	DMT, IAA, MEL, TRP e 5-HIAA	BARKER, S. A., et. al. (70)	2013

Dentre os trabalhos citados anteriormente, há métodos complexos, com etapas demoradas entre o preparo da amostra e a corrida analítica, gasto elevado de solventes orgânicos (como diclorometano na extração de MEL), utilização de grande volume de amostra, nos quais apenas o TRP e alguns de seus metabólitos presente nas vias catabólicas são determinados (52-62). Há na literatura, um método para a análise de alguns metabólitos presentes nas três rotas do TRP que foram analisados em soro, urina e cultura de células dendríticas, porém este método utiliza como padrão interno todos os padrões isotopicamente marcados de cada metabólito, o que é muito oneroso para um método de rotina (69).

Dos métodos acima, 16 % utilizam tampão fosfato na fase móvel, 8 % formiato de amônio e 8 % acetato de amônio. Na detecção 56 % utilizam ESI-LC-MS/MS, 22 % utilizam Fluorescência e 22 % dos métodos utilizam detecção espectrofotométrica (UV, PDA). No preparo de amostras, 56 % dos trabalhos utilizam precipitação de proteínas, 28 % extração em fase sólida e 8 % extração líquido-líquido.

Assim sendo, até o momento, há na literatura mais de 330 trabalhos com o intuito de detectar e quantificar os metabólitos do triptofano (busca realizada via Pubmed e *Web of Science,* data: 27/10/2015). Mesmo com os avanços da tecnologia, principalmente na área analítica, muitos métodos por HPLC acoplado a diferentes tipos de detectores foram publicados. Contudo, novos métodos analíticos ainda são necessários, principalmente no que se diz respeito a análise simultânea de metabólitos do TRP pertencentes as rotas da via QUIN, SER, DMT e metabólitos de abertura de anel (AMK, AFMK, DMK, DMFK e DMT-OH), os quais ainda não possuem muitos estudos presentes na literatura.

Para isso, nosso método trará a análise simultânea de 16 metabólitos do triptofano das vias QUIN, SER, DMT e respectivamente seus metabólitos de abertura de anel indólico, com as seguintes vantagens: rápida análise, fácil processo de concentração da amostra e baixo gasto de material para uma análise de rotina.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para o monitoramento dos produtos das vias metabólicas do triptofano em linhagem celular de gliomas humanos.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

 Desenvolver um método bioanalítico por HPLC para a determinação quantitativa dos metabólitos do TRP presentes nas vias QUIN, SER e DMT, utilizando detecção por espectrometria de massas;

 Otimizar um método de extração para a obtenção dos metabólitos presente nas vias das QUIN, SER e DMT nos sobrenadantes celulares dos gliomas A172 e T98G;

 (ii) Validação do método de acordo com o órgão regulador (ANVISA, RDC nº 27, de 17 de maio de 2012);

(M) Avaliação do impacto do uso dos inibidores da IDO e TDO (1-*DL*-MT e 680C91, respectivamente) e o uso do IFN-γ, indutor clássico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. SOLVENTES E REAGENTES

L-triptofano (pureza >98%), *L*-triptofano-d5 (indol-d5) (97%), ácido quinurênico (98%), ácido nicotínico (>99,5%), ácido indolacético (98%), *L*-quinurenina sal sulfato, ácido xanturênico (96%), cloridrato de serotonina (>98%), triptamina (98%), 1-metil-*DL*-triptofano (1-MT, 97%), cloridrato de *L*-triptofano metiléster (TME, 98%), melatonina (98%), ácido quinolínico (99%), quinuramina dihidrobrometo, ácido hidróxi-indol-acético (>98%) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Ácido hidróxi-indol-acético-d2 (HIAA-d2, 98,7%) foi doado gentilmente pelo Dr. Valdemir Meleccho de Carvalho (Pesquisador do Grupo FLeury). Melatonina-D7 (MEL-D7) foi obtida pela empresa Cambridge Isotopes (Massachussets, EUA). AMK, AFMK and DMT foram sintetizados e purificados em nosso laboratório de acordo com protocolos previamente descritos na literatura (31,89). Ácido Antranílico foi gentilmente doado pelo Prof. Dr. Jair Ribeiro Chagas (Departmento de Psicobiologia, Universidade Federal de São Paulo).

A água utilizada é ultra-pura obtida pelo sistema Milli-Q (Merck Millipore, Germany). Os solventes para o preparo e extração das amostras e para as análises po ESI-LC-MS/MS foram grau analítico e obtidos pela empresa Merck (Darmstadt, Germany). Os cartuchos *Phree Phospholipids Removal* foram adquiridos pela Phenomenex (CA,USA). Os tubos Spin-X para filtrar as amostras (Costar, 0.22 µm) foram adquiridos pela Corning (NY, USA). O meio de cultura RPMI 1640, soro fetal bovino e os antibióticos penicilina and estreptomicina foram obtidos pela Gibco (Life Technologies, New York, USA).
3.2. PREPARO DOS PADRÕES

Soluções estoques individuais dos padrões foram preparados numa concentração de 10 mmol.L⁻¹ e estocados a - 80 °C, com exceção do AFMK e AMK que foram preparados a uma concentração de 55 mmol.L⁻¹ e 50 mmol.L⁻¹, respectivamente. TRY, DMT, IAA, AA, KA, QUIM, MEL and NA foram preparados em Metanol; SER, AMK, AFMK, HIAA and QUIN foram preparados em água Mili-Q; Trp-D5 foi preparado em uma solução (1:1) contendo água:metanol e QA and XA foram preparados em uma solução de 0.1 M de hidróxido de sódio. Um mix dessas soluções estoques foi preparada contendo uma concentração final de 500 µmol.L⁻¹ de todos os analitos. Uma solução estoque dos padrões internos (PI) (MEL-D7, TME and HIAA-D5) contendo uma concentração de 0,5 mmol.L⁻¹ foi preparada em metanol, gerando um mix com concentrações finais de 4,18 µmol.L⁻¹, 50 µmol.L⁻¹ e 50 µmol.L⁻¹, respectivamente, os quais foram estocados a - 80 °C. 10 µL do mix do PI foi adicionado nas amostras, onde o mesmo obteve uma concentração final de 81,7 nmol.L⁻¹, 0,98 µmol.L⁻¹ and 0,98 µmol.L⁻¹ de MEL-D7, TME e HIAA-D5, respectivamente. MEL-D7 foi utilizado como PI dos metabólitos MEL, AMK, AFMK, DMT e IAA; TME foi utilizado como PI dos analitos AA, TRY, KA, Trp e XA e o HIAA-D5 foi utilizado como PI dos analitos NA, QUIM, QA, SER, HIAA E QUIN.

3.3. INSTRUMENTAÇÃO

O espectrômetro de massas utilizado no desenvolvimento e validação da metodologia é composta por uma bomba binária LC 1250 Bin Pump VL, auto-injetora 1260 HiP ALS, (todos da Agilent Technologies, Califórnia, Estados Unidos) e um espectrômetro de massas 6460 - Triplo Quadrupolo LC/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 Multiple Reaction Monitoring (MRM). Uma coluna de faser reversa Luna C18(2) (150 mm x 2 mm, 3 µm) adquirida pela empresa Phenomenex (Torrance, CA, USA) foi utilizada para a separação cromatográfica dos analitos. A coluna foi mantida a 35 °C durante as análises e após a otimização do estudo da fase móvel, a cromatografia foi adquirida por um gradiente de eluição composto por 10 mmol.L⁻¹ de formiato de amônio em água com pH 2,1 ajustado com ácido fórmico (A) e acetonitrila (B). O volume de injeção aplicado foi de 5 µL com um fluxo de 0,2 mL.min⁻¹. Todo efluente da coluna foi encaminhado ao espectrômetro de massas sem split. O gradietne de eluição utilizado foi: (i) 0 - 15 min (100(A):0(B) - 5(A):95(B), v/v); (ii) 15 - 16 min (5(A):95(B), v/v); (iii) 16 – 17 min ((5(A):95(B) - 100(A):0(B), v/v); (iv) 17 – 22 min (100(A):0(B), v/v); (iv) 18 – 20 min (100(A):0(B), v/v); (iv) 18 – 20 min (100(A):0(B), v/v); (iv) 18 – 20 min (1v/v) para reequilibrar a coluna.

A condição do espectrômetro de massas foi otimizada pela infusão direta uma solução mix de 10 µmol.L⁻¹ de cada analito com um fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, para a obtenção dos valores dos íons precursor e dos íons produto de acordo com o software Optmizer (Agilent Technologies, Califórnia, Estado Unidos), os quais estão presentes na Tabela 2. Outros parâmetros do MS 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.

Analitas	TR	Q1	Q3	DT			CAV
Analitos	(min)	(<i>m/z</i>)	(<i>m/z</i>)	(ms)	DF (V)	EC (V)	(V)
NA	3,81	124,0	80,0	20	103	22	3
QA	4,10	168,1	78,0	20	41	20	3
SER	5,66	177,2	160,0	20	50	10	3
QUIN	6,03	209,0	94,0	20	54	10	3
QUIM	6,24	165,2	136,0	20	54	10	3
TRP ⁵H	6,77	210,2	192,1	20	73	13	3
TRP	6,81	205,2	146,0	20	49	14	3
ХА	6,99	206,1	160,0	20	89	18	3
TRY	7,18	161,2	144,0	20	45	10	3
KA	7,37	190,0	89,0	20	84	46	3
DMT	7,53	189,0	58,1	20	74	10	3
HIAA	7,82	192,0	146,0	20	59	14	3
AMK	8,68	237,0	136,0	20	74	18	3
AFMK	8,92	265,0	136,0	20	84	22	3
AA	9,16	138,2	120,0	20	36	15	3
MEL	9,86	233,1	174,0	20	79	14	3
IAA	10,12	176,0	130,0	20	79	14	3
DI	TR	Q1	Q3	DT	עע פט		CAV
	(min)	(<i>m/z</i>)	(<i>m/z</i>)	(ms)	DF (V)	LC (V)	(V)
TME	7,79	219,1	160,00	20	60	14	3
HIAA-D2	7,81	194,2	148,00	20	91	8	3
MEL-D7	9,79	240,0	178,10	20	70	14	3

Tabela 2 - Parâmetros de otimização dos analitos de interesse.

TR, tempo de retenção; DT, dwell time; DP, declustering potential; EC, energia de colisão; CAV, cell accelerator voltage; PI, padrão interno.

3.4. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO POR ESI-LC-MS/MS

Para iniciar o desenvolvimento de um método analítico é necessário, primeiramente, estudar os compostos de interesse, neste caso as moléculas de estudo são: TRP, QUIN, KA, AA, XA, QA, NA, QUIM, SER, 5-HIAA, MEL, AFMK, AMK, TRY, DMT e IAA. Dados obtidos através de uma simples avaliação da estrutura molecular dos compostos podem ajudar na escolha da técnica analítica. Neste trabalho, através de uma avaliação computacional do software ACDlabs e do site chemicalize, foi avaliado informações das características físico-químicas da substância de interesse, como logP, pKa, solubilidade, entre outros (73). A partir dessas informações, conseguimos escolher a melhor técnica analítica para a determinação dos compostos que foi o uso de um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo, o qual é indicado para a quantificação exata e confirmação de analitos em níveis traço em matrizes complexas, apresentando alta seletividade e sensibilidade. Dessa forma, otimizamos os parâmetros de ionização de cada analito através das análises realizadas em modo íon precursor (50-500 m/z) e utilização do software Optimizer, a fim de se obter o melhor fragmento para a análise por MRM, descrito anteriormente no item 3.3. - Instrumentação. Dentre as tentativas de desenvolvimento do método analítico foram avaliadas as fases estacionárias Sinergy POLAR-RP, Zorbax SB-C18 e Luna C18(2) com diferentes combinações de fases móveis, fluxos, diferentes gradientes, diferentes volumes de injeção e também temperatura das colunas que pudesse abranger a análise de todos os metabólitos do Trp com características ácidas, básicas, neutras e anfóteras. A Tabela 3 apresenta as condições cromatográficas final do método de análise por LC-ESI-MS/MS para detecção simultânea dos metabólitos em modo de ionização positivo.

Tabela 3 - Condições cromatográficas do método para determinação do Trp e seus metabólitos.

Condições Cromatográficas							
Fase Estacionária	Coluna Lu	una C18(2) (150	x 2.0 mm x				
	3 μm)						
Fase Móvel	A – 10 mn pH 2.1. ai	nol.L ⁻¹ Formiato ustado com ácio	de Amônio, lo fórmico				
	B – Acetonitrila						
Diluente	Água:MeOH (acidificado com 0,1 %						
	de ácido f	órmico)					
Fluxo	0,2 ml.min ⁻¹						
Temperatura	37 °C						
Volume de injeção	5 μL						
Gradiente	Tempo (min) %A	%B				
	0	100	0				
	15	5	95				
	16	5	95				
	17	100	0				
	22	100	0				

3.5. EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

Diversos testes de extração foram realizados afim de otimizar um método de extração para a obtenção dos metabólitos presente nas vias das QUIN, SER e aminas traço em gliomas humanos. Como sabemos, os fosfolipídeos endógenos são a primeira fonte de supressão iônica e resulta num maior efeito matriz nos métodos bioanalíticos por LC-MS. A supressão iônica causada pela presença dos fosfolipídeos pode ocasionar em resultados não reprodutíveis, perda de sensibilidade do método e efeito matriz altíssimo.

Para isso, utilizamos uma coluna denominada *Phree* da Phenomenex que impede o gotejamento do solvente orgânico para a completa precipitação de proteína dentro da placa, elimina os fosfolipídeos que causam supressão iônica, permitindo remover proteínas que possam danificar a coluna cromatográfica e aumentando o tempo de vida da mesma e é utilizada para o preparo de amostra de todos os tipos de compostos, dentre eles, ácidos,

básicos e neutros.

3.6. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

A validação bioanalítica para os metabólitos do TRP foi realizada seguindo a RDC 27/2012 da Agência Brasileira de Vigilância Sanitária (ANVISA), pois a mesma revogou a partir de 1 de dezembro de 2012 a Secção de Métodos Bioanalíticos do anexo da Resolução RE 899/2003. O nosso trabalho se encaixa na Seção IX para métodos em que a matriz biológica isenta do analito não está disponível. Desssa forma, a validação realizada para esse tipo de matriz compreende os seguintes testes: seletividade, precisão, exatidão, efeito residual e efeito matriz.

3.6.1. SELETIVIDADE E EFEITO RESIDUAL

A seletividade é a capacidade do método em diferenciar e quantificar o analito e o padrão interno na presença de outros componentes da amostra. No caso do presente estudo, onde há presença de alguns metabólitos disponíveis na matriz, a seletividade foi avaliada através da injeção de um conjunto de dez amostras não enriquecido de seis meios RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco, Invitrogen) diferentes. De acordo com a RDC 27 (43 Art.), a seletividade pode ser testada pela comparação das inclinações de 6 (seis) curvas de adição padrão na matriz biológica (contendo um nível basal do analito) e da curva padrão em solução (91). O método é considerado seletivo se as inclinações das curvas não forem significativamente diferentes e deve ser definido previamente um modelo estatístico para comparação das inclinações. Neste trabalho, o Triptofano-D5 foi utilizado em curvas de calibração para corrigir o conteúdo de Trp no meio de cultura.

O efeito residual, o qual é um efeito gerado pelo aumento do sinal do analito ou PI causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente, pode ser avaliado em solução, onde deve ser realizada 3 (três) injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma ou mais amostras processadas do Limite Superior de Quantificação (LSQ).

3.6.2. EARIDADE, LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE INFERIOR DE QUANTIFICAÇÃO

A linearidade/curva de calibração é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. De acordo com o Art. 43 da RDC 27, em matriz não isenta do analito de interesse a curva de calibração/linearidade pode ser avaliada em solvente. Dessa forma, a linearidade do método analítico foi calculada por três curvas de calibração padrão que foram calculados utilizando a razão entre as áreas do pico do analito e do padrão interno versus o valor nominal da concentração de 15 pontos da curva de calibração (0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 e 50 µmol.L -1). A faixa linear para cada analito foi avaliado de acordo com o limite inferior de quantificação (LIQ) e o limite superiore de quantificação (LSQ), definidos como a menor e o maior ponto com precisão entre 80-120 % e imprecisão inferior a 20% para LIQ e precisão entre 85-115 % e imprecisão inferior a 15% para os outros padrões de calibração. O limite de detecção (LOD) é a menor concentração de um analito que o procedimento bioanalítico consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo, neste estudo foi determinado pelo sinal – ruído (S/N) maior que 2 a 3 vezes ao ruído da linha de base.

3.6.3. RECISÃO E EXATIDÃO

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz, já a exatidão é avaliada pela concordância entre o resultado de um ensaio e um valor de referência. Ambos devem ser determinados em uma mesma corrida (precisão intracorrida) e em, no mínimo, 3 (três) corridas diferentes (precisão intercorridas). Em cada corrida devem ser realizadas no mínimo 5 (cinco) replicatas em, pelo menos, 3 (três) concentrações: CQB (controle de qualidade baixo), CQM (controlede qualidade médio) e CQA (controle de qualidade alto). A precisão deve ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) e a exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo para os dois, valores superiores a 15% (quinze por cento), exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (vinte por cento). O cálulo para a precisão e exatidão são as seguintes:

3.6.4. RECUPERAÇÃO E EFEITO MATRIZ

A recuperação de uma substântcia em um ensaio, refere-se a resposta do detector obtido quando uma quantidade específica do analito a ser analisado é adicionado e recuperado apartir de uma matriz biológica (no nosso caso, células tumorais), em comparação com a resposta do detector para a solução padrão. Ou seja, mede a eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém, admitese valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata. O procedimento de extração foi avaliado pela área de cada analito dividido pelo seu padrão interno correspondente e foi comparado entre as amostras sem os componentes da matriz (preparados apenas em solvente) e com os componentes da matriz (adicionados dos padrões de cada analito antes da extração). Já o efeito matriz, mede o efeito da resposta do analito ou PI causado por componentes da matriz biológica. No presente trabalho, ele foi avaliado da mesma maneira que a recuperação, porém com uma matriz já processada, onde a mesma é adicionada dos padrões de cada analito depois do procedimento de extração. Para cada amostra analisada deve ser obtido o fator de matriz normalizado pelo PI (FMN) e o CV% dos FMNs de todas as amostras não devem ser superiores a 15 %, abaixo segue a fórmula para o cálculo dos FMNs:

FMN = <u>Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz</u> Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução

O procedimento de extração da recuperação foi avaliada pelas amostras controle de qualidade (baixo, médio e alto) - baixo (2 nmol.L⁻¹ para QUIM, TRY, DMT, MEL, AFMK; 20 nmol.L⁻¹ para NA, KA, SER, AMK; 50 nmol.L⁻¹ para XA; 100 nmol.L⁻¹ para IAA; 200 nmol.L⁻¹ para AA, QUIN, QA, HIAA; 500 nmol.L⁻¹ para TRP), médio (10 nmol.L⁻¹1 para MEL, AFMK; 50 nmol.L⁻¹ para QUIM, TRY, DMT; 100 nmol.L⁻¹ para KA, AMK; 200 nmol.L⁻¹ para SER, XA; 500 nmol.L⁻¹ para NA, IAA; 2 µmol.L⁻¹ para QA; 5 µmol.L⁻¹ para AA, QUIN, HIAA; 10 µmol.L⁻¹ para TRP) e alto (20 nmol.L⁻¹ para MEL, AFMK; 100 nmol.L⁻¹ para QUIM, TRY, DMT; 200 nmol.L⁻¹ para KA, AMK; 500 nmol.L⁻¹ para QA; 10 µmol.L⁻¹ para AA, QUIN, HIAA; 500 nmol.L⁻¹ para SER, XA; 1 µmol.L⁻¹ para NA, IAA; 5 µmol.L⁻¹ para QA; 10 µmol.L⁻¹ para AA, QUIN, HIAA; 20 µmol.L⁻¹ para TRP). Já o efeito matriz, foi analisado em amostras de matrizes biológicas processadas, posteriormente adicionadas de analito e PI, em soluções, nas mesmas concentrações das amostras de CQB e CQA.

3.7. TERMINAÇÃO DOS METABÓLITOS DO Trp EM LINHAGENHS DE GLIOMA HUMANO

3.7.1. CONDIÇÕES DE CULTURAS CELULARES

As linhagens celulares A172 e T98G originadas de glioblastomas celulares (ATCC) com propriedade aderente foram fornecidas pela Profa Dra. Ana Campa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas- USP. As células das linhagens de glioma humano A172 e T98G foram cultivadas em estufa (5% de CO₂). A partir do terceiro estágio de cultivo, 2,0x10⁵ (A172) e 1,7x10⁵ (T98G) células por poço foram utilizadas para os ensaios em triplicata com os estímulos de IFN-γ (50 ng.mL⁻¹), 1-*DL*-MT (1 mmoles.L⁻¹) e 680C91 (20 µmoles.L⁻¹), que foram adicionados às culturas celulares, e após o período de 24 h, o sobrenadante foi separado para determinação dos analitos de interesse. O meio de cultura utilizado foi o RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Gibco, Invitrogen) e foi suplementado com 10% de SFB.

3.7.2. REPARO DA AMOSTRA

Após o período de incubação das células com os tratamentos citados no item 3.7.1. -Condições de Culturas Celulares, 500 μL de meio de cultura foi separado e adicionado a um microtubo âmbar de 2 mL contendo 1,5 mL de Metanol 100 % gelado, seguidamente foi adicionado 10 μL do mix do Pl. Os tubos foram agitados por 1 min e acondicionados no freezer a -20 °C por 1h. Após esse período as amostras foram centrifugadas por 10 min a 14.000 g a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e filtrado na placa *Phree Phospholipid Removal* utilizando um sistema a vácuo. As amostras foram então transferidas para um tubo de vidro e foram secas em vazão de gás nitrogênio. Para reconstituir as amostras, 100 μL de uma solução de MeOH:H2O (1:9) contendo 0.1 % de ácido fórmico (v/v) foram adicionados a cada tubo de vidro, que foram agitados em Vortex por 1 min, transferidos para um tubo filtro SpinX, 0.22 μm (Costar, Corning, USA), centrifugados por 3 min a 14.000 g e 5 μL foram injetados no equipamento.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados serão expressos como média ± dp de, no mínimo, três experimentos independentes realizados em triplicata. Os resultados serão submetidos à análise estatística para testes de variância utilizando-se o teste ANOVA e o teste de Tukey para comparações múltiplas de médias. Valores de p iguais ou menores que 0,05 indicadores da concentração de significância de pelo menos 5% entre as diferenças encontradas, serão considerados estatisticamente significativos. Outras abordagens estatísticas também serão consideradas caso haja necessidade.

CAPÍTULO 1. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO

4.1. ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS DOS COMPOSTOS

No início de um desenvolvimento de método, as informações disponíveis sobre a composição química das amostras devem ser revistas. Se os compostos presentes na amostra forem ácidos ou básicos, será necessário adicionar um tampão na fase móvel, de modo a controlar o pH e os valores de pKa para os analitos (72). O peso molecular dos analitos também pode afetar a escolha das condições de separação para as experiências iniciais.

Na Tabela 4, segue as principais características físico-químicas dos 16 compostos presentes no metabolismo do TRP.

Metabólitos	LogP (73)	pKa (73)	pKa1(73)	pKa2 (73)	pKa3 (73)	pKa4 (73)	pKa5 (73)	Solubilidade Experimental
TRP	-1,09	16.16 HN HN H2.9.40 OH 2.54	2.54	9.40	16.16	-	-	Metanol:Água (1:1)
QUIN	-1,91	3.26 -9.99 8.96 NH ₂ O NH ₂ 16.07 OH ^{1.19}	-9.99	1.19	3.26	8.96	16.07	Água

Tabela 4 - Principais características físico-químicas dos metabólitos do TRP.

KA	0,75	10.944.07 OH N 4.76	-4.07	0.96	4.76	10.94	_	Metanol
AA	1,45	0.96 19.44 ,1.95 H ₂ N	1.95	4.89	19.44	-	_	Metanol
ХА	0,78	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	-5.02 9.14	-4.02 11.96	1.05	4.47	-	0,1 M NaOH
QA	-0,54	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0.29	3.89	5.26	-	-	Metanol
NA	-0,17	2.79 HO O N 4.19	2.79	4.19	-	-	-	Metanol
QUIM	0.66	NH _{29.51}	2.58	9.51	15.94	-	-	Metanol
SER	0,48	H ₁ N 10.00 H ₁ N	-5.51	9.31	10.00	18.22	-	Água

		4.22 HO						
5-HIAA	1,41	9.565.51 HN 17.37	-5.51	4.22	9.56	17.37	-	Agua
MEL	1,15	16.59 HN CH ₃ -0.94 H ₃ C	-4.83	-0.94	15.80	16.59	-	Metanol
AFMK	0,34	H ₃ C -5.02 H ₃ C -5.02 H ₃ C -5.02 H ₃ C -5.02 H _{14.91} CH ₃ CH ₃ -4.33	-5.02	-4.33	-0.95	7.78	13.90 16.15	Água
АМК	0,33	H ₃ C +6.48 H ₃ C +0.92 +0.92 +0.92 +0.92 +0.92 +0.92 +0.92 +0.92 +0.92 +0.92 +0.92 +0.92 +0.92 +0.92 +0.92 +0.92 +0.92 +0.92 +0.92 +0.94 +0.92 +0.94 +0 +0.94 +0 +0 +0 +0 +0 +0 +0 +0 +0 +0 +0 +0 +0	-9.65	-6.48	-0.92	3.19	15.22 15.54	Água
TRY	1,49	H ₂ N 9.73	9.73	17.17	-	-	-	Metanol
DMT	2,30	$H_3C \xrightarrow{N}_{9.55}CH_3$	9.55	17.16	-	-	-	Metanol



Com as informações acima e com base na literatura foi possível definir que o método de detecção que seria desenvolvido por HPLC, no presente trabalho, foi a espectrometria de massas em *tandem*, sendo que esta técnica auxilia na identificação dos metabólitos do Trpem concentrações mais baixas. Uma das principais vantagens de se acoplar um HPLC a um detector MS/MS do tipo triplo quadrupolo, é que o mesmo permite obter a fragmentação e identificação dos compostos de interesse com alto grau de confiança, além de ser muito utilizada para a quantificação de pequenas moléculas e ainda permite alta especificidade, sensibilidade e precisão dos resultados, o que não seria possível apenas com base nas características de retenção/eluição dos compostos, fornecidas por outros detectores utilizados em HPLC como DAD e fluorescência (74). A seguir está descrito a otimização do método, sua validação e aplicação.

4.2. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO POR LC-MS

Através da avalição físico-química das moléculas, otimizamos os parâmetros de ionização de cada analito, afim de obter os melhores fragmentos dos íons precursores, obtendo os íons produto de maior intensidade para posterior análise do triptofano e seus metabólitos por MRM, descrito anteriormente no item 3.3. – Instrumentação. Dessa forma, a avaliação dos fragmentos e possíveis perdas de grupos funcionais das moléculas de estudo estão detalhadas e apresentadas abaixo.

O íon $[M+H]^+$ foi observado no espectro de massas do ácido nicotínico (124 *m/z*), representado na Figura 5, nele observamos dois íons de maior intensidade 78 *m/z* e 80*m/z*, que representa a perda de CO₂.



30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)

Figura 5 - Espectro de fragmentação do ácido nicotínico (Tr 3,813 min), [M+H]⁺ 124 *m/z*, ESI-QqQ em modo positivo de ionização.

Para o ácido quinolínico, o íon [M+H]⁺ observado no espectro de massas foi de 168 m/z,

representado na Figura 6, nele observamos o íon 78 m/z, que representa a perda de dois CO₂.



Figura 6 - Espectro de fragmentação do ácido quinolínico (Tr 4,101 min), [M+H]⁺ 168 *m/z*, ESI-QqQ em modo positivo de ionização.

Para a serotonina, o íon $[M+H]^+$ observado no espectro de massas foi de 177 *m/z*, representado na Figura 7, nele observamos o íon de maior intensidade 160 *m/z*, que representa a perda de NH₃.



Figura 7 - Espectro de fragmentação da serotonina (Tr 5,664 min), [M+H] + 177 *m/z*, ESI-QqQ em modo positivo de ionização.

Para a quinurenina, o íon $[M+H]^+$ observado no espectro de massas foi de 209 *m/z*, representado na Figura 8, nele observamos os íons de maior intensidade 94 *m/z* e 192 *m/z*, que representam respectivamente a perda de NH₃ e todo o conjunto da cadeia lateral.



Figura 8 - Espectro de fragmentação da quinurenina (Tr 6,031 min), [M+H] + 209 *m/z*,ESI-QqQ em modo positivo de ionização. Para a quinuramina, o íon $[M+H]^+$ observado no espectro de massas foi de 165 *m/z*, representado na Figura 9, nele observamos os íons de maior intensidade 148 *m/z* e 136 *m/z*, que representam respectivamente a perda de dois NH₃.



Figura 9 - Espectro de fragmentação da quinuramina (Tr 6,245 min), [M+H] + 165 *m/z*,ESI-QqQ em modo positivo de ionização.

Para o triptofano-D5, o íon $[M+H]^+$ observado no espectro de massas foi de 210 m/z, representado na Figura 10, nele observamos o íon de maior intensidade 192 m/z, que representa a perda de NH₃.



30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 Counts vs. Mass-to-Charge (m/z) Figura 10 -. Espectro de fragmentação do triptofano-D5 (Tr 6,770 min), [M+H] + 210 m/z,ESI-

QqQ em modo positivo de ionização.

Para o ácido xanturênico, o íon $[M+H]^+$ observado no espectro de massas foi de 206 *m/z*, representado na Figura 11, nele observamos o íon de maior intensidade 160 *m/z*, que representa a perda de CO₂.



Figura 11 - Espectro de fragmentação do ácido xanturênico (Tr 6,997 min), [M+H] + 206 *m*/*z*,ESI-QqQ em modo positivo de ionização.

Para a triptamina, o íon $[M+H]^+$ observado no espectro de massas foi de 161 *m/z*, representado na Figura 12, nele observamos o íon de maior intensidade 144 *m/z*, que representa a perda de NH₃.



Figura 12 - Espectro de fragmentação da triptamina (Tr 7,186 min), [M+H] ⁺ 161 *m/z*,ESI-QqQ em modo positivo de ionização.

Para o ácido quinurênico, o íon $[M+H]^+$ observado no espectro de massas foi de 190 *m/z*, representado na Figura 13, nele observamos o íon de maior intensidade 144 *m/z*, que representa a perda de CO₂ e C₃H₅O.



Figura 13 - Espectro de fragmentação do ácido quinurênico (Tr 7,1371 min), [M+H] + 190 *m/z*,ESI-QqQ em modo positivo de ionização.

Para a dimetiltriptamina, o íon $[M+H]^+$ observado no espectro de massas foi de 189 m/z, representado na Figura 14, nele observamos o íon de maior intensidade 58 m/z, que representa a perda de C₃H₉N⁺.



Figura 14 - Espectro de fragmentação da dimetiltriptamina (Tr 7,532 min), [M+H] + 189 *m/z*, ESI-QqQ em modo positivo de ionização.

Para a ácido-5-hidróxiindolacético, o íon $[M+H]^+$ observado no espectro de massas foi de 192 *m/z*, representado na Figura 15, nele observamos o íon de maior intensidade 146 *m/z*, que representa a perda de CO₂.



Figura 15 - Espectro de fragmentação do ácido-5-hidróxiindolacético (Tr 7,822 min), [M+H]⁺ 192 *m/z*,ESI-QqQ em modo positivo de ionização.

Para o AMK, o íon [M+H]⁺ observado no espectro de massas foi de 237 *m/z*, representado na Figura 16, nele observamos os íons de maior intensidade 178 *m/z*, 160 *m/z* e 136 *m/z*, que representam as perdas da amida, NH₃ e C₂H₅.



Figura 16 - Espectro de fragmentação do AMK (Tr 8,667 min), [M+H] + 237 *m/z*,ESI-QqQ em modo positivo de ionização.

Para o AFMK, o íon $[M+H]^+$ observado no espectro de massas foi de 265 *m/z*, representado na Figura 17, nele observamos o íon de maior intensidade 136 *m/z*, que representa a perda da amida, C₂H₅ e CH₂NO.



Figura 17 - Espectro de fragmentação do AFMK (Tr 8,920min), [M+H] ⁺ 265 *m/z*,ESI-QqQ em modo positivo de ionização.

Para o ácido indolacético, o íon $[M+H]^+$ observado no espectro de massas foi de 176 *m/z*, representado na Figura 18, nele observamos o íon de maior intensidade 130 *m/z*, que representa a perda de CO_{2..}



Figura 18 - Espectro de fragmentação do ácido indolacético (Tr 10,127min), [M+H] + 176 *m/z*,ESI-QqQ em modo positivo de ionização. Para a melatonina, o íon $[M+H]^+$ observado no espectro de massas foi de 233 *m/z*, representado na Figura 19, nele observamos o íon de maior intensidade 174 *m/z*, que representa a perda da amida.



Figura 19 - Espectro de fragmentação da melatonina (Tr 9,868 min), [M+H] ⁺ 233 *m/z*,ESI-QqQ em modo positivo de ionização.

Para o ácido antranílico, o íon $[M+H]^+$ observado no espectro de massas foi de 138 *m/z*, representado na Figura 20, nele observamos o íon de maior intensidade 120 *m/z*, que representa a perda de CO₂...



Figura 20 - Espectro de fragmentação do ácido antranílico (Tr 9,013 min), [M+H] + 138 *m/z*,ESI-QqQ em modo positivo de ionização.

4.3. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

4.3.1. SELETIVIDADE E EFEITO RESIDUAL

No presente estudo, pudemos confirmar que o método é seletivo a partir da avaliação da razão das inclinações da curva de calibração, as quais não mostraram diferenças significativas e com valores próximos de 1, ou seja, mostrando baixo ganho ou supressão iônica. Segue abaixo na Tabela 5 as comparações das curvas de calibração preparadas em solvente e em matriz para cada um dos metabólitos avaliados. Todos os valores dos desvios de cada curva estão apresentados no item 7. Material Suplementar nos sub itens 7.1. Curvas em solvente do teste de seletividade e 7.2 Curvas em matriz do teste de seletividade.

Analitas	Solvente			Matriz		
Anamos	R²	Equação da curva	R²	Equação da curva	Razau	
	0.986	y = 0,0241x - 0,1008	0.986	y = 0,0233x -0,0834	0.967	
	0.982	y = 0,0233x - 0,0807	0.983	y = 0,0236x - 0,0767	1.013	
NA	0.991	y = 0,0258x - 0,0709	0.985	y = 0,0239x - 0,0988	0.926	
NA	0.985	y = 0,0227x - 0,0052	0.986	y = 0,0243x - 0,0980	1.070	
	0.987	y = 0,0230x - 0,0070	0.982	y = 0,0232x - 0,0918	1.009	
	0.982	y = 0,0238x - 0,0874	0.983	y = 0,0239x - 0,0921	1.004	
	0.995	y = 0,0000162x + 0,0000173	0.996	y = 0,0000163x + 0,0000867	1.006	
	0.996	y = 0,0000161x + 0,0000564	0.995	y = 0,0000160x + 0,000107	0.996	
	0.996	y = 0,0000162x + 0,0000239	0.998	y = 0,0000162x + 0,0000751	1.002	
AA	0.995	y = 0,0000161x + 0,0000715	0.992	y = 0,0000165x + 0,000177	1.026	
	0.996	y = 0,0000166x + 0,0000353	0.992	y = 0,0000164x + 0,000179	0.988	
	0.997	y = 0,0000162x + 0,000103	0.991	y = 0,0000163x + 0,000215	1.006	
	0.985	y = 0,1993x + 0,0585	0.993	y = 0,2559x - 0,0434	1.284	
	0.985	y = 0,1950x + 0,0508	0.993	y = 0,2618x - 0,0412	1.342	
тру	0.986	y = 0,1980x + 0,0429	0.991	y = 0,2650x - 0,0400	1.338	
	0.986	y = 0,1985x + 0,0359	0.991	y = 0,2680x - 0,0540	1.350	
	0.986	y = 0,1930x + 0,0648	0.988	y = 0,2630x - 0,0459	1.363	
	0.989	y = 0,1907x + 0,0730	0.992	y = 0,2640x - 0,0445	1.384	
	0.990	y = 0,2610x + 0,0097	0.991	y = 0,2853x - 0,0376	1.093	
QUIM	0.989	y = 0,2589x + 0,0283	0.994	y = 0,2844x - 0,0265	1.099	
	0.985	y = 0,2692x + 0,0023	0.992	y = 0,2910x - 0,0370	1.081	

Tabela 5 - Seletividade

1		v 0.2700v 0.0191		V 0.2970v 0.0262	1 062
	0.900	y = 0.2700x - 0.0101	0.990	y = 0.2870x - 0.0262	1.003
	0.990	y = 0,2740x - 0,0301	0.907	y = 0.2980x - 0.0485	1.090
	0.992	y = 0.2763x - 0.0366	0.900	y = 0.2959x - 0.0436	0.070
	0.903	y = 0.0012x - 0.0313	0.992	y = 0.0010x + 0.0144	0.072
	0.993	y = 0.0011x + 0.0107	0.992	y = 0.0011x + 0.0064	0.000
QA	0.989	y = 0.0010x + 0.0088	0.993	y = 0,0010x + 0,0157	0.988
	0.992	y = 0.0010x + 0.0097	1.000	y = 0,0010x + 0,0239	1.000
	0.991	y = 0,0011x + 0,0040	0.998	y = 0,0010x + 0,0281	0.949
	0.994	y = 0,0011x + 0,0108	0.997	y = 0,0011x + 0,0160	0.982
	0.983	y = 0,00002x - 0,0002	0.988	y = 0,00003x - 0,0004	1.037
	0.982	y = 0,00003x - 0,0003	0.988	y = 0,00003x - 0,0003	0.973
ΙΑΑ	0.981	y = 0,00003x - 0,0004	0.988	y = 0,00003x - 0,0005	0.987
	0.982	y = 0,00003x - 0,0002	0.983	y = 0,00003x - 0,0005	1.018
	0.983	y = 0,00003x - 0,0003	0.988	y = 0,00003x - 0,0004	0.995
	0.986	y = 0,00003x - 0,0004	0.983	y = 0,00003x - 0,0004	0.962
	0.991	y = 0,1068x + 0,1760	0.991	y = 0,1190x + 0,5350	1.115
	0.988	y = 0,1131x + 0,1599	0.990	y = 0,1164x + 0,5015	1.029
SER	0.991	y = 0,1117x + 0,1874	0.992	y = 0,1149x + 0,5118	1.029
	0.984	y = 0,1119x + 0,1538	0.987	y = 0,1232x + 0,4582	1.100
	0.989	y = 0,1044x + 0,2265	0.990	y = 0,1185x + 0,5799	1.134
	0.983	y = 0,1139x + 0,1273	0.986	y = 0,1161x + 0,5354	1.020
	0.993	y = 0,0028x + 0,000083	0.995	y = 0,0029x - 0,000079	1.024
	0.994	y = 0,0027x - 0,000029	0.994	y = 0,0029x - 0,000072	1.044
рмт	0.993	y = 0,0027x + 0,000025	0.994	y = 0,0029x - 0,000077	1.061
	0.993	y = 0,0027x + 0,000063	0.995	y = 0,0029x - 0,000067	1.082
	0.995	y = 0,0028x + 0,000070	0.993	y = 0,0029x - 0,000073	1.045
	0.995	y = 0,0028x + 0,000025	0.995	y = 0,0029x - 0,000073	1.046
	0.992	y = 0,00003x + 0,00013	0.995	y = 0,00003x + 0,00009	1.038
	0.994	y = 0,00003x + 0,00013	0.995	y = 0,00003x + 0,00008	1.022
	0.993	y = 0,00003x + 0,00012	1.000	y = 0,00003x + 0,00014	0.994
NA	0.989	y = 0,00003x + 0,00007	0.999	y = 0,00003x + 0,00008	1.003
	0.993	y = 0,00003x + 0,00013	0.996	y = 0,00003x + 0,00014	0.980
	0.992	y = 0,00003x + 0,00009	0.998	y = 0,00003x + 0,00011	1.002
	0.999	y = 0,0010x - 0,0041	0.994	y = 0,0009x - 0,0024	0.952
	0.997	y = 0,0010x - 0,0102	0.994	y = 0,0010x + 0,0055	0.998
	0.995	y = 0,0010x + 0,0009	0.992	y = 0,0010x - 0,0071	0.991
HIAA	0.995	y = 0,0010x - 0,0020	0.992	y = 0,0010x - 0,0065	1.003
	0.997	y = 0,0010x - 0,0004	0.994	y = 0,0009x + 0,0064	0.999
	0.998	y = 0.0010x + 0.0056	0.994	y = 0.0009x - 0.0015	0.992
	0.987	y = 0.00002x + 0.00025	0.986	y = 0.00002x + 0.00015	1.033
	0.984	y = 0.00002x + 0.00025	0.987	y = 0,00002x + 0.00011	0.963
XA	0.985	y = 0.00002x + 0.00020	0.992	y = 0.00002x + 0.00014	0.891
	0.990	y = 0.00002x + 0.00023	0.984	y = 0,00002x + 0.00005	0.962

	0.985	y = 0,00002x + 0,00026	0.990	y = 0,00002x + 0,00013	1.023
	0.991	y = 0,00002x + 0,00024	0.989	y = 0,00002x + 0,00012	0.868
	0.983	y = 0,0050x + 0,0124	0.989	y = 0,0052x - 0,0301	1.027
	0.991	y = 0,0051x + 0,0033	0.992	y = 0,0053x - 0,0266	1.042
	0.990	y = 0,0049x + 0,0296	0.991	y = 0,0052x - 0,0202	1.055
QUIN	0.987	y = 0,0049x + 0,0339	0.992	y = 0,0052x - 0,0194	1.052
	0.983	y = 0,0049x - 0,0009	0.990	y = 0,0052x - 0,0204	1.057
	0.988	y = 0,0051x + 0,0143	0.987	y = 0,0053x - 0,0245	1.041
	0.989	y = 0,00004x - 0,00216	0.995	y = 0,00004x - 0,00003	0.951
	0.990	y = 0,00004x - 0,00215	0.994	y = 0,00004x - 0,00019	0.932
тор	0.990	y = 0,00004x - 0,00236	0.994	y = 0,00004x - 0,000003	0.907
	0.993	y = 0,00004x - 0,00206	0.992	y = 0,00004x - 0,00008	0.912
	0.988	y = 0,00004x - 0,00222	0.994	y = 0,00004x - 0,00006	0.939
	0.991	y = 0,00004x - 0,00199	0.994	y = 0,00004x - 0,00025	0.942
	1.000	y = 0,0153x + 0,0013	0.996	y = 0,0159x - 0,0005	1.038
	0.999	y = 0.0152x + 0.0009	0.996	y = 0,0160x - 0,0006	1.049
MEI	0.999	y = 0.0152x + 0.0009	0.996	y = 0,0159x - 0,0004	1.046
	0.999	y = 0,0152x + 0,0010	0.996	y = 0,0159x - 0,0004	1.047
	1.000	y = 0.0154x + 0.0008	0.996	y = 0,0159x - 0,0004	1.034
	0.999	y = 0,0151x + 0,0012	0.997	y = 0,0160x - 0,0006	1.053
	0.991	y = 0,0039x - 0,0014	0.991	y = 0,0037x - 0,0011	0.960
	0.994	y = 0,0039x - 0,0012	0.989	y = 0,0040x - 0,0009	1.023
амк	0.990	y = 0,0037x - 0,0010	0.988	y = 0,0040x - 0,0009	1.089
	0.991	y = 0,0037x - 0,0011	0.991	y = 0,0040x - 0,0010	1.101
	0.991	y = 0,0039x - 0,0014	0.991	y = 0,0040x - 0,0010	1.014
	0.994	y = 0,0039x - 0,0014	0.989	y = 0,0040x - 0,0010	1.020
	0.994	y = 0,00069x + 0,00010	0.997	y = 0,00070x + 0,00013	1.022
	0.988	y = 0,00069x + 0,00006	0.997	y = 0,00071x + 0,00011	1.028
ΔΕΜΚ	0.993	y = 0,00068x + 0,00011	0.995	y = 0,00072x + 0,00008	1.049
	0.990	y = 0,00068x + 0,00011	0.997	y = 0,00071x + 0,00012	1.038
	0.988	y = 0,00070x + 0,00004	0.997	y = 0,00070x + 0,00013	1.001
	0.991	y = 0,00069x + 0,00003	0.997	y = 0,00070x + 0,00017	1.013

Quanto ao resultado do efeito residual, o mesmo foi avaliado em solução, para observar se houve o aparecimento ou um aumento de sinal do analito ou PI causado por uma contaminação da análise da amostra anterior, após análise do LSQ, os resultados foram comparados com os obtidos de amostras processadas do LIQ. Como mostra a Figura 21 abaixo, não tivemos interferências significantes.



Figura 21 - (A) Cromatograma do LSQ (limite superir de quantuficação- 50 mmol.L⁻¹); (B) Cromatograma da amostra branco seguida da análise do LSQ.

4.3.2. EARIDADE

A determinação da linearidade foi avaliada através de três curvas preparadas independentemente. O método de regressão linear para as curvas de calibração do Trp e dos seus metabólitos foi de $1/x^2$, os guais estão apresentados na Tabela 6, juntamente com o limite de detecção. Para os limites inferiores de quantificação, o qual é representado pela menor quantidade de um analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, tivemos uma variação entre 1 e 50 nmol.L⁻¹ para a maioria dos analitos, exceto para QA, QUIN, HIAA e AA com LIQ de 100 nmol.L⁻¹ e para o Trp com LIQ de 200 nmol.L⁻¹. Resultados presentes na literatura mostram valores maiores ou comparáveis com os apresentados neste trabalho. De acordo com Cao et. al. (63), ele reportou um LIQ de 28 nmol.L⁻ ¹ de SER, Hou et. al. (92) obteve um LIQ de 29 μmol.L⁻¹ para IAA, de Jong et. al. (5) obteve um LIQ de 130 nmol.L⁻¹ de HIAA, Amirkhani et. al. reportou um LIQ de 11,5 nmol.L⁻¹ para KA, Yamada et. al. e de Jong et. al. mostraram um LIQ de 20 nmol.L⁻¹ e 50 nmol.L⁻¹ de QUIN. Esses valores se mostraram superiores ao LIQ encontrado no nosso trabalho, exceto para Yamada que apresentou um limite inferiro de quantificação igual o nosso para QUIN. Já o limite superior de quantificação para a maioria dos analitos foram entre 0,05 e 20 µmol.L⁻¹ e 200 µmol.L⁻¹ para o Trp. O valor de R² das análises de regressão ao longo do intervalo linear ultrapassou 0,98 para a maioria dos analitos de interesse.

Tabela 6 - Parâmetros de linearidade.

Analitos	Curvas	R ²	LOD (nmol.L ⁻¹)	Faixa Linear (nmol.L ⁻¹⁾
	y = 0,023x - 0,015	0,98		
NA	y = 0,023x + 0,004	0,98	5,0	10,0 - 2.000
	y = 0,023x - 0,010	0,99		
	y = 0,001x - 0,019	0,99		
QA	y = 0,001x - 0,017	0,99	50,0	100,0 - 5.000
	y = 0,001x - 0,019	0,99		
	y = 0,115x + 0,068	0,98		
SER	y = 0,114x + 0,094	0,99	2,0	10,0 - 1.000
	y = 0,119x - 0,425	0,99		
	y = 0,005x - 0,038	0,99		
KYN	y = 0,005x + 0,013	0,99	20,0	100,0 - 20.000
	y = 0,005x + 0,001	0,99		
	y = 0,276x - 0,005	0,99		
KYM	y = 0,299x - 0,003	0,99	0,1	1,0 - 200,0
	y = 0,237x + 0,071	0,98		
	y = 0,00004x + 0,0007	0,99		
TRP ⁵H	y = 0,00004x + 0,0005	0,99	50,0	200,0 - 50.000
	y = 0,00004x + 0,0006	0,99		
	y = 0,00002x + 0,00011	0,99		
XA	y = 0,00002x + 0,00013	0,99	10,0	20,0 - 1.000
	y = 0,00002x + 0,00016	0,99		
	y = 0,00002x + 0,00013	0,99		
TRY	y = 0,00002x + 0,00011	0,99	0,1	1,0 - 50,0
	y = 0,00002x + 0,00015	0,99		
	y = 0,00003x + 0,00009	0,99		
KA	y = 0,00003x + 0,00009	0,99	5,0	10,0 - 500,0
	y = 0,00003x + 0,00007	0,99		
	y = 0,0026x + 0,00013	0,99		
DMT	y = 0,0027x - 0,00016	0,99	0,1	1,0 - 200,0
	y = 0,0028x - 0,00009	0,99		
ΗΙΔΑ	y = 0,0009x - 0,0424	0,99	20.0	100.0 - 20.000
піаа	y = 0,0009x - 0,0510	0,99	20,0	100,0 20.000

	y = 0,0009x - 0,0399	0,99		
	y = 0,0004x - 0,0011	0,99		
AMK	y = 0,0004x - 0,0010	0,99	5,0	10,0 — 500,0
	y = 0,0004x - 0,0009	0,99		
	y = 0,0007x - 0,00011	0,99		
AFMK	y = 0,0007x - 0,00009	0,99	0,1	1,0 - 50,0
	y = 0,0007x - 0,00012	0,99		
	y = 0,00002x + 0,00012	0,99		
AA	y = 0,00002x + 0,00011	0,99	20,0	100,0 – 20.000
	y = 0,00002x + 0,00015	0,99		
	y = 0,0159x - 0,00096	0,99		
MEL	y = 0,0159x - 0,00092	0,99	0,1	1,0 - 50,0
	y = 0,0159 - 0,00119	0,99		
	y = 0,00002x - 0,00024	0,98		
IAA	y = 0,00003x - 0,00033	0,98	20,0	50,0 - 2.000
	y = 0,00003x - 0,00034	0,99		

4.3.3. RECISÃO E EXATIDÃO

A Tabela 7 mostra os resultados de precisão e exatidão que foram obtidos da média de três lotes que foram preparados e realizados em dias diferentes. Os resultados de intra-lista e interlista para precisão variou entre 0,3 % - 14,1 % e 0,5 % - 14,3 %, respectivamente. Os resultados de exatidão variaram entre 88,2 % para 115,1 %.

No caso deste estudo, a precisão e a exatidão foram analisados em 5 réplicas de amostra de LIQ e CQs (baixo, médio e alto). O experimento foi avaliado em três corridas diferentes e foram preparadas e analisadas em diferentes dias.

Analitos	NA	QA	SER	QUIN	QUIM	TRP	XA	TRY
Intra-lista CV (n=5), %								
`LIQ Ű	10,4	7,6	14,1	5,4	8,3	7,3	7,0	10,0
CQB	8,1	7,9	8,0	5,5	6,7	3,2	6,7	3,7
CQM	7,1	3,2	8,0	3,8	5,0	6,4	8,9	5,2
CQA	5,6	7,3	7,2	8,1	4,6	5,6	8,2	5,4
Inter-lista								
CV% (n=5)								
LIQ	10,8	8,9	13,9	9,4	10,1	9,9	11,4	10,7
CQB	11,0	14,3	8,5	5,6	6,9	4,9	6,5	4,1
CQM	8,6	3,9	8,3	3,8	6,0	6,9	8,8	5,5
CQA	7,7	12,9	8,9	8,5	6,2	6,9	13,3	6,4
Exatidão, %								
LIQ	109,7	111,6	115,1	96,2	105,8	111,2	98,7	92,7
CQB	107,2	97,1	105,5	94,2	111,8	109,0	106,6	110,6
CQM	106,2	90,0	111,1	98,5	109,2	110,5	89,3	112,3
CQA	91,6	104,4	95,5	111,6	103,7	105,3	102,5	107,9
Analitos	KA	DMT	HIAA	AMK	AFMK	AA	MEL	IAA
Intra-lista								
CV% (n=5)								
CV% (n=5) LIQ	5,8	10,5	5,3	3,9	3,9	2,8	3,6	5,7
CV% (n=5) LIQ CQB	5,8 7,5	10,5 3,1	5,3 2,7	3,9 4,1	3,9 2,8	2,8 1,6	3,6 1,4	5,7 8,5
CV% (n=5) LIQ CQB CQM	5,8 7,5 2,3	10,5 3,1 0,3	5,3 2,7 9,7	3,9 4,1 3,8	3,9 2,8 1,6	2,8 1,6 2,4	3,6 1,4 2,7	5,7 8,5 6,6
CV% (n=5) LIQ CQB CQM CQA	5,8 7,5 2,3 3,4	10,5 3,1 0,3 8,4	5,3 2,7 9,7 3,2	3,9 4,1 3,8 3,3	3,9 2,8 1,6 1,4	2,8 1,6 2,4 1,9	3,6 1,4 2,7 1,1	5,7 8,5 6,6 7,7
CV% (n=5) LIQ CQB CQM CQA Inter-lista	5,8 7,5 2,3 3,4	10,5 3,1 0,3 8,4	5,3 2,7 9,7 3,2	3,9 4,1 3,8 3,3	3,9 2,8 1,6 1,4	2,8 1,6 2,4 1,9	3,6 1,4 2,7 1,1	5,7 8,5 6,6 7,7
CV% (n=5) LIQ CQB CQM CQA Inter-lista CV (n=5), %	5,8 7,5 2,3 3,4	10,5 3,1 0,3 8,4	5,3 2,7 9,7 3,2	3,9 4,1 3,8 3,3	3,9 2,8 1,6 1,4	2,8 1,6 2,4 1,9	3,6 1,4 2,7 1,1	5,7 8,5 6,6 7,7
CV% (n=5) LIQ CQB CQM CQA Inter-lista CV (n=5), % LIQ	5,8 7,5 2,3 3,4 8,5	10,5 3,1 0,3 8,4 12,3	5,3 2,7 9,7 3,2 8,4	3,9 4,1 3,8 3,3 5,6	3,9 2,8 1,6 1,4 3,8	2,8 1,6 2,4 1,9 4,4	3,6 1,4 2,7 1,1 4,6	5,7 8,5 6,6 7,7 8,9
CV% (n=5) LIQ CQB CQM CQA Inter-lista CV (n=5), % LIQ CQB	5,8 7,5 2,3 3,4 8,5 8,3	10,5 3,1 0,3 8,4 12,3 3,7	5,3 2,7 9,7 3,2 8,4 4,9	3,9 4,1 3,8 3,3 5,6 4,9	3,9 2,8 1,6 1,4 3,8 2,9	2,8 1,6 2,4 1,9 4,4 1,8	3,6 1,4 2,7 1,1 4,6 1,5	5,7 8,5 6,6 7,7 8,9 8,3
CV% (n=5) LIQ CQB CQM CQA Inter-lista CV (n=5), % LIQ CQB CQM	5,8 7,5 2,3 3,4 8,5 8,3 2,6	10,5 3,1 0,3 8,4 12,3 3,7 0,5	5,3 2,7 9,7 3,2 8,4 4,9 11,2	3,9 4,1 3,8 3,3 5,6 4,9 4,7	3,9 2,8 1,6 1,4 3,8 2,9 1,6	2,8 1,6 2,4 1,9 4,4 1,8 2,6	3,6 1,4 2,7 1,1 4,6 1,5 4,5	5,7 8,5 6,6 7,7 8,9 8,3 6,4
CV% (n=5) LIQ CQB CQM CQA Inter-lista CV (n=5), % LIQ CQB CQM CQA	5,8 7,5 2,3 3,4 8,5 8,3 2,6 5,3	10,5 3,1 0,3 8,4 12,3 3,7 0,5 7,9	5,3 2,7 9,7 3,2 8,4 4,9 11,2 4,0	3,9 4,1 3,8 3,3 5,6 4,9 4,7 4,4	3,9 2,8 1,6 1,4 3,8 2,9 1,6 1,7	2,8 1,6 2,4 1,9 4,4 1,8 2,6 3,1	3,6 1,4 2,7 1,1 4,6 1,5 4,5 1,3	5,7 8,5 6,6 7,7 8,9 8,3 6,4 7,6
CV% (n=5) LIQ CQB CQM CQA Inter-lista CV (n=5), % LIQ CQB CQM CQA Exatidão, %	5,8 7,5 2,3 3,4 8,5 8,3 2,6 5,3	10,5 3,1 0,3 8,4 12,3 3,7 0,5 7,9	5,3 2,7 9,7 3,2 8,4 4,9 11,2 4,0	3,9 4,1 3,8 3,3 5,6 4,9 4,7 4,4	3,9 2,8 1,6 1,4 3,8 2,9 1,6 1,7	2,8 1,6 2,4 1,9 4,4 1,8 2,6 3,1	3,6 1,4 2,7 1,1 4,6 1,5 4,5 1,3	5,7 8,5 6,6 7,7 8,9 8,3 6,4 7,6
CV% (n=5) LIQ CQB CQM CQA Inter-lista CV (n=5), % LIQ CQB CQM CQA Exatidão, % LIQ	5,8 7,5 2,3 3,4 8,5 8,3 2,6 5,3 94,3	10,5 3,1 0,3 8,4 12,3 3,7 0,5 7,9 88,2	5,3 2,7 9,7 3,2 8,4 4,9 11,2 4,0 99,8	3,9 4,1 3,8 3,3 5,6 4,9 4,7 4,4 113,6	3,9 2,8 1,6 1,4 3,8 2,9 1,6 1,7 99,6	2,8 1,6 2,4 1,9 4,4 1,8 2,6 3,1 107,5	3,6 1,4 2,7 1,1 4,6 1,5 4,5 1,3 91,8	5,7 8,5 6,6 7,7 8,9 8,3 6,4 7,6
CV% (n=5) LIQ CQB CQM CQA Inter-lista CV (n=5), % LIQ CQB CQM CQA Exatidão, % LIQ CQB	5,8 7,5 2,3 3,4 8,5 8,3 2,6 5,3 94,3 97,5	10,5 3,1 0,3 8,4 12,3 3,7 0,5 7,9 88,2 94,0	5,3 2,7 9,7 3,2 8,4 4,9 11,2 4,0 99,8 99,1	3,9 4,1 3,8 3,3 5,6 4,9 4,7 4,4 113,6 102,0	3,9 2,8 1,6 1,4 3,8 2,9 1,6 1,7 99,6 106,1	2,8 1,6 2,4 1,9 4,4 1,8 2,6 3,1 107,5 111,4	3,6 1,4 2,7 1,1 4,6 1,5 4,5 1,3 91,8 101,4	5,7 8,5 6,6 7,7 8,9 8,3 6,4 7,6
CV% (n=5) LIQ CQB CQM CQA Inter-lista CV (n=5), % LIQ CQB CQM CQA Exatidão, % LIQ CQB CQA	5,8 7,5 2,3 3,4 8,5 8,3 2,6 5,3 94,3 97,5 106,8	10,5 3,1 0,3 8,4 12,3 3,7 0,5 7,9 88,2 94,0 96,1	5,3 2,7 9,7 3,2 8,4 4,9 11,2 4,0 99,8 99,1 110,1	3,9 4,1 3,8 3,3 5,6 4,9 4,7 4,4 113,6 102,0 88,3	3,9 2,8 1,6 1,4 3,8 2,9 1,6 1,7 99,6 106,1 106,7	2,8 1,6 2,4 1,9 4,4 1,8 2,6 3,1 107,5 111,4 103,3	3,6 1,4 2,7 1,1 4,6 1,5 4,5 1,3 91,8 101,4 111,9	5,7 8,5 6,6 7,7 8,9 8,3 6,4 7,6 108,7 103,2 112,4

Tabela 7 - Resultados de precisão e exatidão para o triptofano e seus metabólitos.

4.3.4. RECUPERAÇÃO E EFEITO MATRIZ

As análises cromatográficas de substâncias presentes em matrizes complexas (soro, plasma, urina, cultura celular, etc.), em geral, requerem um pré-tratamento da amostra. O motivo disso é a complexidade das matrizes biológicas, que apresentam interferentes, muitas vezes com concentrações altas, como por exemplo, as proteínas (complexos grandes) e metabólitos. O uso de um análogo marcado isotopicamente do analito é geralmente considerado como a melhor escolha em bioanálise por LC-MS/MS, devido à grande semelhança entre as propriedades físico-químicas das substâncias, seus comportamentos semelhantes durante a preparação da amostra, cromatografia e ionização no espectrômetro de massas. No entanto, devido ao elevado custo do material de referência marcado com deutério e/ou ¹³C, procuramos três substâncias alternativas que satisfaçam os critérios das características físico-químicas dos metabólitos, a fim de ter um comportamento semelhante aos dos analitos, tanto na preparação da amostra, na cromatografia e na detecção por MS. Para isso, foram escolhidos como padrões internos o HIAA-D2, MEL-D7 e TME. Os mesmos foram utilizados para três grupos dos metabólitos, em três períodos da corrida cromatográfica, a fim de minimizar o número de transições em simultâneo na corrida. Eles também satisfazem os critérios de logP semelhante, solubilidade em água/metanol e a polaridade de ionização por MS/MS (modo positivo). O uso dos mesmos trouxe uma economia considerável em termos de tempo e dinheiro (em relação à compra de todos os metabólitos isotopicamente marcados). Dessa forma, podemos mostrar na Tabela 8 os resultados da recuperação e efeito matriz. No que diz respeito aos analitos e o padrão interno, encontramos recuperações entre de 85,1 % e 114,9 % e efeitos da matriz entre -11,7% e 13,7%.

68

Analytac		Recovery		Matrix	Effect
Analytes	CQB (%)	CQM (%)	CQA (%)	CQB (%)	CQA (%)
NA	104,3	93,5	108,2	12,7	-10,1
QA	101,8	98,5	114,1	-6,6	12,0
SER	112,0	106,2	102,8	9,4	-1,0
QUIN	105,3	87,6	97,4	13,7	-0,2
QUIM	112,1	100,4	114,6	-4,7	10,5
TRP	88,0	100,4	91,7	4,0	-10,7
XA	99,8	96,3	102,1	0,2	-2,9
TRY	113,1	109,7	99,4	12,4	11,4
KA	94,1	106,1	98,8	-10,0	-4,5
DMT	90,8	88,8	108,3	-4,0	10,7
HIAA	92,5	85,2	98,7	1,0	11,0
AMK	98,7	113,9	114,9	-5,9	12,9
AFMK	95,8	105,9	106,0	4,5	0,8
AA	114,3	110,2	113,0	13,5	-3,8
MEL	103,1	102,0	110,1	-4,1	-11,7
IAA	114,6	85,1	112,3	7,7	1,7
ISTD		Recovery		Matrix	Effect
TME		95,9		-6	,0
HIAA-D2		87,5		-3	,7
MEL-D7		113,5		-1	,7

Tabela 8 - Recuperação e efeito matriz.

CQB, Controle de qualidade baixo; CQM, Controle de qualidade médio; CQA, Controle d qualidade alto.

CAPÍTULO 2. ESTUDO DO METABOLISMO DE Trp EM LINHAGENS TUMORAIS DE GLIOMA HUMANO

4.4. TERMINAÇÃO DOS METABÓLITOS DO Trp EM CÉLULAS DE GLIOMA HUMANO

Após desenvolvermos e validarmos uma metodologia analítica robusta, precisa e sensível que permite a determinação e quantificação de 16 metabólitos de interesse do metabolismo de triptofano, avaliamos os tratamentos conhecidos na literatura que influenciam na formação de alguns desses metabólitos em duas linhagens de células tumorais de glioma humano, denominados A172 e T98G, a fim de se observar a flutuação desses metabólitos nesses tratamentos. Sabe-se que células da glia humana e células de glioma possuem concentrações elevadas da enzima IDO e que sua atividade aumenta na presença de IFN- γ (93). Dentre as linhagens de gliomas, a A172 e T98G foram escolhidas como modelos experimentais nesta tese, pois estudos presentes na literatura mostraram que apesar de ambas possuírem IDO, a A172 é uma célula constitutivamente TDO positiva. Assim, estudamos o metabolismo de Trp nessas duas células, sendo que não há nenhum relato prévio da avaliação conjunta das três vias metabólicas. O interesse nessas rotas é que elas levam a formação de muitas moléculas biologicamente ativas com ações bastante abrangentes. Por exemplo serotonina afeta o qual é um neurotransmissor e vem sendo utilizado em patologias como a ansiedade, depressão, obesidade, enxaqueca e esquizofrenia, entre outros. Sabe-se ainda que MEL, além da ação no ritmo circadiano, é um importante mediador das interações neuroimunes, atuando em receptores de membrana, modulando a proliferação de linfócitos T, a geração de citocinas e fator de crescimento. Já os seus metabólitos de abertura de anel AMK e AFMK possuem capacidade antioxidativa (16). Adicionalmente, em se tratando de câncer, vários destes compostos mostram efeitos na proliferação, migração e invasão celular (40,94,95).

Os tratamentos foram realizados de acordo com os itens 3.7.1 e 3.7.2 descritos

anteriormente nos Materiais e Métodos. Dessa forma, primeiramente, avaliamos os efeitos do indutor da enzima IDO, que é a citocina IFN- γ .

Nas figuras A e C temos o perfil de consumo de Trp e formação dos metabólitos da via das quinureninas nas células A172 e T98G tratadas ou não com IFN-γ. Como esperado, a adição IFN-γ resulta num consumo acentuado de Trp. Em relação à concentração de QUIN a célula A172 possui maior concentração de quinurenina na condição basal. Este resultado está de acordo com o fato desta célula conter TDO. Assim quando a esta célula se adiciona IFN-γ vê-se um aumento de QUIN de 3 vezes, enquanto que para a T98G a produção de QUIN é mais acentuada (12 vezes).

A QUIN é convertida diretamente em AA, KA e 3-HK (que é subsequentemente convertido em XA). É curioso notar que enquanto para a A172 não há muitas modificações nesses intermediários da via QUIN, na T98G há um aumento expressivo de AA (237 vezes) e KA (3 vezes). Para ambas as células houve diminuição de XA, sendo que para a T98G está diminuição foi mais acentuada (7,5 vezes para a A172 e 13 vezes para a T98G). No conjunto, estes dados parecem bastante significativos uma vez que eles evidenciam que a resposta ao IFN- γ vai muito além da formação de QUIN e que esta resposta depende da presença ou não da TDO.

Apesar de não existirem estudos que tenham avaliado as funções biológicas de AA, KA e XA em gliomas, alguns poucos estudos foram feitos com outros tipos celulares. Assim, sabe-se que AA se relaciona a apoptose de células T e direciona para tolerância de células T, através da interação com o receptor AhR (96); KA diminui a secreção de TNF- α por células mononucleares (85) e XA, em células de mamíferos, age como antioxidante sendo capaz de evitar um acúmulo do metabólito 3-HK, o qual induz a produção de radicais livres levando a apoptose (97). Assim, pode-se antever que a ação de IFN- γ sobre células TDO negativas é mais

acentuado e que o painel de metabólitos formados poderia levar a um efeito global que favorece o tumor. Por exemplo, o aumento de AA levaria ao aumento do imunoescape, a diminuição do TNF-α levaria ao aumento da proliferação das células tumorais e a diminuição do XA, fruto da menor produção ou maior consumo, diminuiria o status redox da célula com conseqüente sinalização de processos envolvidos na proliferação celular (98).

Não se observaram diferenças nas concentrações dos produtos avançados da rota das quinureninas QA e QUIM mas sim para o NA. Sabe-se que NA é importante para a síntese de NAD em diversos tipos celulares, incluindo astrócitos (10). Neste trabalho notamos NA é consumido pelas células, sendo o consumo maior para a A172 mas não observamos diferença para elas frente ao tratamento com IFN- γ .

Em relação à via serotonérgica, não vemos muitas diferenças entre A172 e T98G a não ser pela concentração de AMK que é 10,4 vezes maior para a primeira. A ação de IFN-γ se limita a diminuição do AFMK. Apesar de não termos medido como IFN afetaria outras atividades enzimáticas que não as da metabolização do Trp, sabe-se que IFN diminui a expressão de peroxidases, sendo que estas enzimas são bastante ativas na conversão de MEL para AFMK (99 e100).

E em relação à via das aminas traço, merece ser mencionado que apesar de ser considerada muito pouco ativa, vimos no nosso estudo que nesses gliomas ela foi praticamente equivalente a via serotonérgica. Este dado é relevante, pois se começa a descrever os efeitos citotóxicos e imunomodulatórios dos intermediários da via TRY (94 e 101). A presença de IFN- γ afetou pouco esta via; só encontramos diferenças na A172 com diminuição de DMT e IAA (1,3 vezes e 1,4 vezes, respectivamente).






Figura 22 - Efeito da adição de IFN- γ (50 ng.mL⁻¹), em gliomas A172 (A) e T98G (B).





QA

NA

NĂM

NAD

Diminuiu > 2,5x

Diminuiu < 2,5x Aumentou < 2,5x

Aumentou > 2,5x

Posteriormente aos ensaios com IFN-γ, observamos as alterações que a adição do inibidor 1-*DL*-MT promoveu no metabolismo do Trp nas linhagens de glioma humano.

Como citado anteriormente, como a IDO é o passo limitante para o catabolismo de Trp, ela tem sido um foco do segmento farmacêutico para o desenvolvimento de novos medicamentos. O inibidor da enzima IDO, 1-metil-triptofano (1-MT), vem sendo utilizado em estudos clínicos como coadjuvante para quimioterapia (18). Seu nome comercial é o Indoximod e vem sendo usado em vários estudos de fase 2 para tumores mama, pulmão, próstata, dentre outros (102). Apesar do 1-MT ser um inibidor competitivo da IDO e inibir eficientemente a produção de QUIN quando as células são ativadas por IFN-γ, outras ações do 1-MT são esperadas. Por exemplo, Agaulgué e colaboradores mostraram que 1-MT interfere com a sinalização de TLRs em células dendriticas (103) e mais recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que 1-MT é capaz de levar à síntese de MLT em melanomas e células da pele (40) e que 1-MT pode afetar a proliferação, migração e invasão dependendo da célula tumoral, assim como a ação tumoricida de células mononucleraes (95) de forma independente da inibição da IDO.

No nosso estudo, tratamos as células A172 e T98G com 1-MT numa condição sem IFNγ buscando mais detalhes sobre as possíveis alterações que 1-MT trariam para outras etapas da metabolização do Trp que não a produção de QUIN. Observamos que a adição de 1-MT causou um aumento na concentração de Trp na célula A172. Não conseguimos identificar as razões deste aumento. Uma hipótese poderia ser proveniente da contaminação de Trp presente no inibidor 1-MT (89), dado este descrito na literatura anteriormente e comprovado por nós (95) e mudança nos transportadores de Trp por essas células. Seguidamente, a adição de 1-MT leva a um acentuado consumo dos metabólitos KA (diminuição de 25 vezes para A172 e 10,7 vezes para T98G) e XA (diminuição de 28 vezes para A172 e 15 vezes para T98G). Pode-se esperar que estas modificações levem a um impacto sobre a célula tumoral uma vez que, como já dito, estas moléculas têm efeitos biológicos identificados (97 e 104). Em relação a AA, QA, QUIM não vemos diferenças pela adição de 1-MT. A única alteração vista foi na concentração de NA em A172 onde se observou diminuição do consumo (aproximadamente 75%).

Em relação à via serotonérgica e via das aminas traço, vemos de forma geral, uma diminuição na concentração dos metabólitos, com exceção da SER na T98G que teve uma sutil produção (1,3 vezes). Para a A172 vemos um acentuado consumo dos metabólitos MEL (2,4 vezes), AMK (2,4 vezes), AFMK (1,5 vezes). E em relação à via das aminas traço, quando células foram tratadas com 1-MT, a diminuição de TRY e DMT foi de 38 vezes e 1,3 vezes para A172, respectivamente; já a diminuição de TRY e DMT foi de 35 vezes, 2 vezes para T98G.

Um dos resultados que mais nos chamou a atenção foi que ao contrário do que previamente observado para melanomas e células da pele (40), 1-MT não levou a produção de MEL em gliomas. Porém resultados prévios e em andamento no grupo colaborador (95 e maysa) nos fazem pensar que os melanócitos e melanomas têm o metabolismo de triptofano mais ativo e que possivelmente o efeito descrito para 1-MT anterior seja específico de células de pele.



В



Figura 24 - Efeito da adição de 1-DL-MT (1 mmoles.L-1), em gliomas A172 (A) e T98G (B).



DMK AA KYN KA 50HT IAA MEL AFMK XA ΗK QUIM AMK ↓ HAA Legenda Diminuiu > 2,5xQA Diminuiu < 2,5x Aumentou < 2,5x NAD NA 4 Aumentou > 2,5xNĂM

Figura 25 - No painel, são descritas as alterações nas vias de degradação do Trp nas células A172 (A) e T98G (B) tratadas com 1-MT. ND: não detectável; (*) P<0,05; (**) P<0,001; (***) P<0,0001.

Por fim, sabendo da possibilidade de que TDO tenha um efeito no imuno escape de certos gliomas (10), foram feitos testes com o inibidor 680C91, tanto para as células A172 (TDO positiva) como T98G (TDO negativa). Isso nos pareceu relevante pois não se tem muitos estudos desse inibidor na literatura. Uma busca realizada no Pubmed e *Web of Science* mostraram somente 4 trabalhos que descrevem o uso do inibidor 680C91 em ratos e 1 trabalho que utiliza 680C91 em gliomas TDO positivas para observar o consumo de QUIN (opitz).

Como podemos observar, não houve diferença deste tratamento para a célula T98G, exceto para o metabólito NA onde houve um consumo sutil de 1,3 vezes. Já para a célula A172 observamos várias modificações. Houve consumo de QUIN, aumento de consumo de NA (1,1 vezes) e QUIM (1,8 vezes) na via das quinureninas. Quanto aos demais metabólitos dessa via, nós não observamos.

Em relação à via serotonérgica, vemos um consumo dos metabólitos subsequentes a serotonina, os quais são MEL (3,3 vezes), AMK (4,5 vezes) e AFMK (2,2 vezes). Sabe-se na literatura que esse inibidor promove aumento de SER e o metabólito HIAA em cérebro de rato (38). E em relação à via das aminas traço também observamos na A172 um consumo dos metabólitos TRY e DMT quando tratada com 680C91.



A172 + 680C91 50000 40000 Controle 680C91 ND - não detectável 30000 20000 10000 2000 1500 nmol.L⁻¹ 1000 Ϊİ 500 100 80 60 40 20 ND 0 AFMAN HIAA OMI 184 £14 true. AMI TRP PP to +P oP 44 SER with T98 680 50000 Controle 40000 680C91 ND = não detectável 30000 20000 10000 2000

AA



Figura 26 - Efeito da adição de 680C91 (20 $\mu moles.L\mbox{-}1),$ em gliomas A172 (A) e T98G (B).

В



В



Figure 27 - No painel, são descritas as alterações nas vias de degradação do Trp nas células A172 (A) e T98G (B) tratadas com 680C91. ND: não detectável; (*) P<0,05; (**) P<0,001; (***) P<0,0001.

5. CONCLUSÕES

Por meio do desenvolvimento de um método robusto, seletivo e sensível, por LC-MS/MS, pudemos validar uma metodologia capaz de detectar e quantificar 16 metabólitos das vias de catabolização de triptofano e avaliarmos os efeitos metabólicos de IFN-γ, 1-MT e 680C91, respectivamente um indutor e inibidor de IDO e um inibidor de TDO em células de glioma humano.

Quanto a adição de IFN-γ pudemos observar que tanto a célula A172 como a célula T98G são bastante ativas no metabolismo de triptofano e notamos que o IFN- γ não só atua na formação da via QUIN, mas também possui um impacto modesto nas demais rotas.

Já no tratamento com 1-MT, observamos o mesmo tendo mais ação nos metabólitos de Trp, do que somente atuando na enzima IDO, observando a relação Trp-QUIN. Este dado é inédito, pois sabe-se que as células precisam ser primeiramente ativadas por IFN-γ, para depois observar o real efeito que o inibidor da IDO causa nos metabólitos da via QUIN, SER e aminas traço, os quais estão relacionados a um pobre prognóstico.

Por fim, com esses resultados, mostramos a primeira descrição completa, isto é, das 3 rotas conhecidas de metabolização de Trp em específico nessas duas linhagens de célula de glioma humano, podendo supor que estratégias terapêuticas com inibidores da IDO e TDO possam afetar as três vias, produzindo e consumindo compostos que estão relacionados a progressão ou não tumoral.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COLABROY, K. L., BEGLEY, T. P. Tryptophan Catabolism: Identification and Characterization of a New Degradative Pathway. Journal of Bacteriology, v. 187(22), p. 7866-7869, 2005.
- 2 ZHAO, J., CHEN, H.,NI, P., *et al.* Simultaneous determination of urinary tryptophan, tryptophan-related metabolites and creatinine by high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorimetric detection. Journal of Chromatography B, v. 879(26), p. 2720-2725, 2011.
- 3. ZHANG, X., HE, Y., MIN, D., *et al.* Simultaneous determination of tryptophan and Kynurenine in plasma samples of children patients with Kawasaki disease by high-performance liquid chromatography with programmed wavelength ultraviolet detection. Journal of Chromatography B, v. 877, p. 1678-1682, 2009.
- 4. OPITZ, C. A., LITZENBURGER, U. M., SAHM, F., *et al.* An endogenous tumourpromoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. Nature, v. 478(7368), p. 197-203, 2011.
- DE JONG, W. H. A., SMIT, R., BAKKER, S. J. L., *et al.* Plasma tryptophan, Kynurenine and 3-hydroxykynurenine measurement using automated on-line solid-phase extraction HPLC-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B, v. 877(7), p. 603-609, 2009.
- SCHRÖCKSNADEL, K., WIRLEITNER, B., WINKLER, C., et. al. Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. Clinica Chimica Acta, v. 364, p. 82-90, 2006.
- WIDNER, B., LEBLHUBER, F., WALLI, J., *et al.* Tryptophan degradation and immune activation in Alzheimer's disease. Journal of Neural Transmission, v. 107(3), p. 343-353, 2000.
- SWARTZ, K. J., DURING, M. J., FREESE, A., *et al.* Cerebral synthesis and release of kynurenic acid: an endogenous antagonist of excitatory amino acid receptors. J Neurosci, v. 10(9), p. 2965-73, 1990.
- 9. NEMETH, H., TOLDI, J., VECSEI, L. Kynurenines, Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders: preclinical and clinical studies. J Neural Transm Suppl, v. 70, p. 285-304, 2006.
- OPITZ, C. A., WICK, W., STEINMAN, L., *et al.* Tryptophan degradation in autoimmune diseases. CLLEular and Molecular Life Sciences, v. 64(19-20), p. 2542-2563, 2007.

- KEMA, I. P., DE VRIES, E. G. E., MUSKIET, F. A. J., *et al.* Clinical chemistry of serotonin and metabolites. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, v. 747, p. 33-48, 2000.
- 12. NORDLIND, K., AZMITIA, E. C., SLOMINSKI, A., *et al.* **The skin as a mirror of the soul: exploring the possible roles of serotonin.** Exp Dermatol, v. 17(4), p. 301-311, 2008.
- 13. SUGDEN, D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. CLLEular and Molecular Life Sciences, v. 45(10), p. 922-932, 1989.
- 14. HARUMI, T., MATSUSHIMA, S. Separation and assay methods for melatonin and its precursors. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, v. 747(1-2), p. 95-110, 2000.
- 15. XIMENES, V. F., SILVA, S. O., RODRIGUES, M. R., *et al.* **Superoxide-dependent oxidation of melatonin by myeloperoxidase.** J Biol Chem, v. 280(46), p. 38160-38169, 2005.
- TAN, D.X., MANCHESTER, L. C., BURKHARDT, S., et al. N1-acetyl-N2-formyl-5methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. The FASEB Journal, v. 15(12), p. 2294-2296, 2001.
- KIM, S. Y., KIM, M. K., KWON, S. B., *et al.* Tumor apoptosis by indole-3-acetic acid/light in B16F10 melanoma-implanted nude mice. Archives of Dermatological Research, v. 301(4), p. 319-322, 2009.
- PLATTEN, M., WICK, W., VAN DEN EYNDE, B. J., et al. Tryptophan Catabolism in Cancer: Beyond IDO and Tryptophan Depletion. Cancer Research, v. 72(21), p. 5435-5440, 2012.
- 19. CHEN, Y., GUILLEMIN, G. J. Kynurenine Pathway Metabolites in Humans: Disease and Healthy States. International Journal of Tryptophan Research, v. 2, p. 1-19, 2009.
- 20. MUNN, D. H., MLLEOR, A. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. The Journal of Clinical Investigation, v. 117(5), p. 1147-1154, 2007.
- 21. TAKIKAWA, O. Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3dioxygenase-initiated *L*-tryptophan metabolism. Biochem Biophys Res Commun, v. 338(1), p. 12-19, 2005.
- 22. METZ, R., DUHADAWAY, J. B., KAMASANI, U., et al. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3dioxygenase inhibitory compound *D*-1-methyl-tryptophan. Cancer Res, v. 67(15), p. 7082-7087, 2007.
- 23. PILOTTE, L., LARRIEU, P., STROOBANT, V., *et al.* **Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 109(7), p. 2497-2502, 2012.

- 24. GUILLEMIN, G. J., SMITH, D. G., SMYTHE, G. A., et al. Expression of the Kynurenine pathway enzymes in human microglia and macrophages. Adv Exp Med Biol, v. 527, p. 105-112, 2003.
- 25. FUJIGAKI, S., SAITO, K., SEKIKAWA, K., *et al.* Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN-gamma-independent mechanism. Eur J Immunol, v. 31(8), p. 2313-2318, 2001.
- 26. FALLARINO, F., GROHMANN, U., HWANG, K. W., *et al.* **Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells.** Nat Immunol, v. 4(12), p. 1206-1212, 2003.
- 27. KEMA, I. P., MEIJER, W. G., MEIBORG, G. *et al.* Profiling of Tryptophan-related Plasma Indoles in Patients with Carcinoid Tumors by Automated, On-Line, Solid-Phase Extraction and HPLC with Fluorescence Detection. Clinical Chemistry, v. 47(10), p. 1811-1820, 2001.
- 28. HEVIA, D., MAYO, J. C., QUIROS, I., *et al.* Monitoring intracellular melatonin levels in human prostate normal and cancer cells by HPLC. Anal Bioanal Chem, v. 397(3), p. 1235-1244, 2010.
- 29. SILVA, S. O., RODRIGUES, M. R. R., XIMENES, V. F., *et al.* **Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release.** Journal of Neuroimmunology, v. 156, p. 146-152, 2004.
- 30. SILVA, S. O., CARVALHO, S. R., XIMENES, V. F., *et al.* Melatonin and its kynureninlike oxidation products affect the microbicidal activity of neutrophils. Microbes Infect, v. 8(2), p. 420-425, 2006.
- SILVA, S. O., XIMENES, V. F. LIVRAMENTO, J. A., et al. High concentrations of the melatonin metabolite, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxyquinuramine, in cerebrospinal fluid of patients with meningitis: a possible immunomodulatory mechanism. J Pineal Res, v. 39(3),p. 302-306, 2005.
- 32. RIBA, J., RODRIGUEZ-FORNLLES, A., URBANO, G., *et al.* Subjective effects and tolerability of the South American psychoactive beverage Ayahuasca in healthy volunteers. Psychopharmacology (Berl), v. 154(1), p. 85-95, 2001.
- FONTANILLA, D., JOHANNESSEN, M., HAJIPOUR, A. R., *et al.* The hallucinogen *N*,*N*-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator. Science, v. 323(5916), p. 934-937, 2009.
- 34. NICLOU, S. P., FACK, F., RAJCEVIC, U. Glioma proteomics: Status and perspectives. Journal of Proteomics, v. 73(10), p. 1823-1838, 2010.
- 35. SAHM, F., OEZEN, I., OPITZ, C. A., *et al.* The Endogenous Tryptophan Metabolite and NAD+ Precursor Quinolinic Acid Confers Resistance of Gliomas to Oxidative Stress. Cancer Research, v. 73(11), p. 3225-3234, 2013.

- WANG, J., HAO, H., YAO, L., *et al.* Melatonin suppresses migration and invasion via inhibition of oxidative stress pathway in glioma cLLEs. Journal of Pineal Research, v. 53(2), p. 180-187, 2012.
- 37. MIYAZAKI, T., MORITAKE, K., YAMADA, K., *et al.* **Indoleamine 2,3-dioxygenase as a new target for malignant glioma therapy.** Journal of Neurosurgery, v. 111(2), p. 230-237, 2009.
- 38. SALTER, M., HAZELWOOD, R., POGSON, C. I., *et al.* The effects of a novel and selective inhibitor of tryptophan 2,3-dioxygenase on tryptophan and serotonin metabolism in the rat. Biochemical Pharmacology, v. 49(10), p. 1435-1442, 1995.
- 39. PLATTEN, M., WLLEER, M., WICK, W. Shaping the glioma immune microenvironment through tryptophan metabolism. CNS Oncology, v. 1(1), p. 99-106, 2012.
- MORENO, A. C., CLARA, R. O., COIMBRA, J. B., *et al.* The expanding roles of 1methyl-tryptophan (1-MT): in addition to inhibiting kynurenine production, 1-MT activates the synthesis of melatonin in skin cells. FEBS J, v. 280(19), p.4782-92, 2013.
- 41. ZHEN, Q., XU, B. MA, L., *et al.* Simultaneous determination of tryptophan, Kynurenine and 5-hydroxytryptamine by HPLC: Application in uremic patients undergoing hemodialysis. Clinical Biochemistry, v. 44, p. 226-230, 2011.
- 42. YAMADA, K.; MIYAZAKI, T.; SHIBATA, T.; *et al.* Simultaneous measurement of tryptophan and related compounds by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B, v. 867(1), p. 57-61, 2008.
- 43. MILLER, A. G.; BROWN, H.; DEGG, T.; *et al.* Measurement of plasma 5hydroxyindole acetic acid by liquid chromatography tandem mass spectrometry-Comparison with HPLC methodology. Journal of Chromatography B, v. 878, p. 695-699, 2011.
- 44. ISHII, K.; OGAYA, T.; SONG, Z.; *et al.* Changes in the plasma concentrations of Dkynurenine and kynurenic acid in rats after intraperitoneal administration of tryptophan enantiomers. Chirality,v. 22, p. 901-906, 2010.
- 45. FANG, L.; PARTI, R.; HU, P. Characterization of N-acetyltryptophan degradation products in concentrated human serum albumin solutions and development of an automated high performance liquid chromatography-mass spectrometry method for their quantitation. Journal of Chromatography A, v. 1218, p. 7316-7324, 2011.
- 46. KRCMOVA, L.; SOLICHOVA, D.; MELICHAR, B.; *et al.* Determination of neopterin, Kynurenine, tryptophan and creatinine in human serum by high throuput HPLC.Talanta, v. 85, p. 1466-1471, 2011.
- 47. LIU, L.; CHEN, Y.; ZHANG, Y.; *et al.* Determination of tryptophan and Kynurenine in human plasma by liquid chromatography–electrochemical detection with multi-

wall carbon nanotube-modified glassy carbon electrode. Biomedical Chromatography, v. 25, p. 938-942, 2011.

- 48. MA, L.; XU, B.; WANG, W.; *et al.* Analysis of tryptophan catabolism in HBV patients by HPLC with programmed wavelength ultraviolet detection. Clinica Chimica Acta, v. 405, p. 94-96, 2009.
- 49. IIZUKA, H.; ISHII, K.; HIRASA, Y.; *et al.* Fluorescence determination of d- and ltryptophan concentrations in rat plasma following administration of tryptophan enantiomers using HPLC with pre-column derivatization. Journal of Chromatography B, v. 879, p. 3208-3213, 2011.
- 50. ZHAO, J.; GAO, P.; ZHU, D. Optimization of Zn2+-containing mobile phase for simultaneous determination of kynurenine, kyurenic acid and tryptophan in human plasma by high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B, v. 878, p. 603-608, 2010.
- 51. GUPTA, N. K.; THAKER, A. I.; KANURI, N.; *et al.* Serum analysis of tryptophan catabolism pathway: Correlation with Crohn's disease activity. Inflammatory Bowel Diseases, p. n/a-n/a, 2011.
- 52. WIDNER, B.; WERNER, E. R.; SCHENNACH, H.; *et al.* **Simultaneous measurement** of serum tryptophan and Kynurenine by HPLC. Clin Chem, v. 43(12), p. 2424-2426, 1997.
- 53. MEFFORD, I. N.; BARCHAS, J. D. Determination of tryptophan and metabolites in rat brain and pineal tissue by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. J Chromatogr, v. 181(2, p. 187-93,1980.
- 54. HERVÉ, C.; BEYNE, P.; JAMAULT, H.; *et al.* Determination of tryptophan and its Kynurenine pathway metabolites in human serum by high-performance liquid chromatography with simultaneous ultraviolet and fluorimetric detection. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, v. 675(1), p. 157-161, 1996.
- 55. LAICH, A.; NEURAUTER, G.; WIDNER, B.; *et al.* More Rapid Method for Simultaneous Measurement of Tryptophan and Kynurenine by HPLC. Clinical Chemistry, v. 48(3), p. 579-581, 2002.
- 56. HOLMES, E. W. Determination of serum Kynurenine and hepatic tryptophan dioxygenase activity by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem, v. 172(2), p. 518-25, 1988.
- 57. DURGBANSHI, A.; ARBONA, V.; POZO, O.; *et al.* **A.** Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. J Agric Food Chem, v. 53(22), p. 8437-8442, 2005.

- 58. FISCHER, T. W.; SWEATMAN, T. W.; SEMAK, I.; *et al.* Constitutive and UV-induced metabolism of melatonin in keratinocytes and cell-free systems. The FASEB Journal, v. 20(9), p.1564-1566, 2006.
- 59. YONG, S.; LAU, S. Rapid separation of tryptophan, kynurenines, and indoles using reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of chromatography, v. 175(2),p. 343-6, 1979.
- 60. AMIRKHANI, A.; HELDIN, E.; MARKIDES, K. E; et al. Quantitation of tryptophan, Kynurenine and kynurenic acid in human plasma by capillary liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, v.780(2), p. 381-7,2002.
- 61. MIDTTUN, O.; HUSTAD, S.; UELAND, P. M. Quantitative profiling of biomarkers related to B-vitamin status, tryptophan metabolism and inflammation in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom, v. 23(9), p. 1371-9, 2009.
- 62. Eriksson Kr, Östin A, Levin J-O. Quantification of melatonin in human saliva by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using stable isotope dilution. Journal of Chromatography B, v. 794(1), p. 115-123, 2003.
- 63. CAO, J.; MURCH, S. J.; O'BRIEN, R., *et al*.Rapid method for accurate analysis of melatonin, serotonin and auxin in plant samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr A, v. 1134(1-2), p. 333-7, 2006.
- 64. MORITA, I.; KAWAMOTO, M.; HATTORI, M.; et al. Determination of tryptophan and its metabolites in human plasma and serum by high-performance liquid chromatography with automated sample clean-up system. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, v. 526(0), p. 367-374, 1990.
- 65. FORSSTROM, T.; TUOMINEN, J.; KARKKAINEN, J. Determination of potentially hallucinogenic N-dimethylated indoleamines in human urine by HPLC/ESI-MS-MS. Scand J Clin Lab Invest, v. 61(7), p. 547-56, 2001.
- 66. MITSUHASHI, S.; FUKUSHIMA, T.; TOMIYA, M.; *et al.* Determination of Kynurenine levels in rat plasma by high-performance liquid chromatography with pre-column fluorescence derivatization. Anal Chim Acta, v. 584(2), p. 315-21, 2007.
- MONAGHAN, P. J.; BROWN, H. A.; HOUGHTON, L. A.; *et al.* Measurement of serotonin in platelet depleted plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, v. 877(22), p. 2163-7, 2009.
- 68. GREGERSEN, K.; FROYLAND, L.; BERSTAD, A.; *et al.* Direct determination of serotonin in gut lavage fluid by liquid chromatographic ion trap tandem mass spectrometry. Talanta, v. 75(2), p. 466-72, 2008.
- 69. ZHU, W.; STEVENS, A.; DETTMER, K.; 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(10), p. 3249-3261, 2011.

- 70. BARKER, S. A.; BORJIGIN, J.; LOMNICKA, I.; *et al.* LC/MS/MS analysis of the endogenous dimethyltryptamine hallucinogens, their precursors, and major metabolites in rat pineal gland microdialysate. Biomed Chromatogr, 2013.
- 71. AGILENT. **Agielent Zorbax SB-C18 datasheet.** Disponível em: http://www.chem.agilent.com/Library/datasheets/Public/820644-002f.pdf>. Acesso em 9 jan 2013.
- 72. SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J., DOLAN, J. W. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Edição: Wiley. New Jersey, 2010. 912p. ISBN 978-0-470-16754-0.
- 73. CHEMICALIZE. Produzido por ChemAxon. Disponível em <www.chemicalize.org>
- 74. CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. Quím. Nova, v. 31, p. 623-636. 2008.
- 75. PHENOMENEX. **Synergi POLAR-RP Specifications**. Disponível em: <www.phenomenex.com>. Acesso em 9 jan 2013.
- 76. AGILENT. Agielent Zorbax column selection guide for HPLC. Disponível em:<http://www.chromtech.com/Catalog/ProductLine/brochures/Zorbax_Guide.pdf>. Acesso em 9 jan 2013.
- 77. COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.
- 78. KOLE, P. L.; VENKATESH, G.; KOTECHA, J.; *et al.* Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. Biomed Chromatogr, v. 25(1-2), p. 199-217, 2011.
- 79. ANNESLEY, T. M. Ion suppression in mass spectrometry. Clin Chem, v. 49(7), p. 1041-4, 2003.
- 80. KING, R.; BONFIGLIO, R.; FERNANDEZ-METZLER, C.; *et al.* **Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization**. J Am Soc Mass Spectrom,v. 11(11), p. 942-50, 2000.
- 81. DAMS, R.; HUESTIS, M. A.; LAMBERT, W. E.; *et al.* Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. J Am Soc Mass Spectrom, v. 4(11), p. 1290-4, 2003.
- 82. WATERS. Waters Quality Parts, Chromatography and Supplies Catalog 2012/2013. Disponível

http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004075EN.pdf>. Acesso em 13 jan 2013.

- 83. ALBERATI-GIANI, D.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; KOHLER, C.; et al. Regulation of the Kynurenine metabolic pathway by interferon-gamma in murine cloned macrophages and microglia cells. J Neurochem, v. 66(3), p. 996-1004, 1996.
- KIANK, C.; *et al.* Psychological Stress-Induced, IDO1-Dependent Tryptophan Catabolism: Implications on Immunosuppresionin Mice and Humans. Plos One, v. 5, n. 7, ISSN 1932-6203, 2010.
- 85. TISZLAVICZ, Z.; NEMETH, B.; FULOP, F.; et al. Different inhibitory effects of Kynurenic acid and a novel Kynurenic acid analogue on tumors necrosis factoralpha (TNF-alpha) production by mononuclear cells, HMGB1 production by monocytes and HNP1-3 secretion by neutrophils. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v. 383(5), p. 447-55, 2011.
- SRINIVASAN, V.; SPENCE, D. W.; PANDI-PERUMAL, S. R.; *et al.* Therapeutic actions of melatonin in cancer: possible mechanisms. Integr Cancer Ther, v. 7(3), p. 189-203, 2008.
- 87. DE ALMEIDA, E. A., MARTINEZ, G. R., KLITZKE, C. F., et al. Oxidation of melatonin by singlet molecular oxygen (O2(1deltag)) produces N1-acetyl-N2-formyl-5methoxykynurenine. J Pineal Res, v. 35(2), p. 131-7, 2003.
- 88. GOMES, M., COIMBRA, J., CLARA, R., *et al.* Biosynthesis of *N,N*-dimethyltryptamine (DMT) in a melanoma cell line and its metabolization by peroxidases. Biochemical Pharmacology. Submetido 2014.
- TOURINO, M. C., DE OLIVEIRA, E. M., BELLÉ, L. P., et al. Tryptamine and dimethyltryptamine inhibit indoleamine 2,3 dioxygenase and increase the tumorreactive effect of peripheral blood mononuclear cells. Cell Biochemistry and Function v. 31(5), p. 361-364, 2013.
- 90. ADAMS, S., BRAIDY, N., BESSESDE, A., *et al.* **The Kynurenine Pathway in Brain Tumor Pathogenesis.** Cancer Research, v. 72(22), p. 5649-5657, 2012.
- 91. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Seção IX, p. 9.
- 92. HOU, D. Y., MULLER, A. J., SHARMA, M. D., *et al.* Inhibition of indoleamine 2,3dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. Cancer Research v. 67(2), p.792-801, 2015.
- 93. GRANT, R.S., NAIF H., ESPINOSA M., et al. IDO induction in IFN-gamma activated astroglia: a role in improving cell viability during oxidative stress. Redox Rep. v 5(2-3) p. 101-104, 2000.

- 94. COIMBRA, J. B., Ação de metabólitos da via das triptaminas em linhagens de melanomas. TESE DOUTORADO p. 187, 2015.
- 95. BRANQUINHO, M. S. F., Efeitos dos inibidores de IDO e TODO na proliferação, migração e invasão de melanomas humanos e na atividade tumoricida de células mononucleares. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, p. 95, 2015.
- 96. AUSTIN, C. J. D., RENDINA, L. M., Targeting key dioxygenases in tryptophankynurenine metabolism for immunomodulation and cancer chemotherapy. Drug Discov Today. v. 20(5), p. 609-617, 2015.
- 97. GOBAILLE, S., KEMMEL, BRUMARU, D., *et al.* Xanthurenic acid distribution, transport, accumulation and release in the rat brain. Journal of Neurochemistry. v. 105(3), p. 982-993, 2008.
- 98. ACHARYA, A., DAS, I., CHANDHOK, D., *et al.* Redox regulation in câncer. A doubleedged sword with therapeutic potential. Oxid Med Cell Longev. v.3(1), p. 23-34, 2010.
- KAWANO, S., TATSUMI, E., YONEDA, N., *et al.* Suppression of gene expression of myeloperoxidase (MPO) by gamma-interferon (IFN-gamma) in HL60 cells. Lymphokine Cytokine Res. v.12(2), p. 81-85, 1993.
- 100.RODRIGUES, M.R., RODRIGUEZ, D., HENRIQUE CATALANI, L., *et al.* Interferongamma independent oxidation of melatonin by macrophages. J Pineal Res. v. 34(1), p. 69-74, 2003.
- 101.GOMES, M. M., COIMBRA, J. B., CLARA, R. O., *et al.* Biosynthesis of N,Ndimethyltryptamine (DMT) in a melanoma cell line and its metabolization by peroxidases. Biochem Pharmacol. v. 88(3), p. 393-401, 2014.
- 102.ZHAI, L., SPRANGER, S., BINDER, D. C., *et al.* Molecular Pathways: Targeting IDO1 and Other Tryptophan Dioxygenases for Cancer Immunotherapy. Clin Cancer Res. [Epub ahead of print], 2015.
- 103.AGAUGUÉ, S., PERRIN-COCON, L., COUTANT, F. et al. 1-Methyl-tryptophan can interfere with TLR signaling in dendritic cells independently of IDO activity. J Immunol. v. 177(4), p.2061-2071, 2006.
- 104.VEZZANI, A., GRAMSBERGEN, J. B., VERSARI, P., *et al.* Kynurenic acid synthesis by human glioma. J Neurol Sci. v. 99(1), p. 51-57,1990.

7. MATERIAL SUPLEMENTAR

7.1. Curvas em solvente do teste de seletividade

ÁCIDO NICOTÍNICO



Concentração (nmol.L ⁻¹)	Área	Área PI	Desvio(%)	Resposta
10	3042	19628	6,13	0,15
20	6658	19432	-8,02	0,34
50	12695	13648	-14,47	0,93
100	25710	10112	9,65	2,54
200	49021	11486	-9,39	4,27
500	128307	9376	14,36	13,68
1000	198327	8673	-4,73	22,87
2000	421044	8218	6,47	51,23



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Desvio(%)	Resposta
10	3301	19445	0,17	7,46
20	6608	20100	0,33	-12,16
50	12606	13400	0,94	-12,35
100	25979	10055	2,58	14,31
200	48495	12089	4,01	-12,21
500	129742	9804	13,23	14,25
1000	197275	8815	22,38	-3,64
2000	421659	8683	48,56	4,35



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Desvio(%)	Resposta
10	3526	19125	0,18	-0,95
20	5245	11371	0,46	3,23
50	13249	11826	1,12	-7,58
100	25508	9508	2,68	6,81
200	54691	9962	5,49	7,85
500	131879	11201	11,77	-8,11
1000	197941	8642	22,90	-10,88
2000	407399	7216	56,46	9,63



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Desvio(%)	Resposta
10	3515	15167	4,20	0,23
20	5927	14338	-7,97	0,41
50	13091	12775	-9,43	1,02
100	27473	10809	11,97	2,54
200	53916	11085	7,03	4,86
500	156070	11989	14,51	13,02
1000	195351	9951	-13,67	19,63
2000	408370	9616	-6,64	42,47



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Desvio(%)	Resposta
10	3644	15280	6,40	0,24
20	6170	15421	-11,77	0,40
50	12893	12638	-10,96	1,02
100	27445	10623	12,28	2,58
200	53746	10945	6,57	4,91
500	154924	12148	10,61	12,75
1000	194713	8932	-5,48	21,80
2000	411067	9648	-7,65	42,61



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Desvio(%)	Resposta
10	3262	18990	8,75	0,17
20	6540	20161	-13,61	0,32
50	12890	13655	-13,45	0,94
100	26112	10313	9,90	2,53
200	48897	11505	-9,01	4,25
500	128676	9836	10,51	13,08
1000	196565	8890	-6,87	22,11
2000	423853	7827	13,78	54,15

ÁCIDO QUINOLÍNICO



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Desvio(%)	Resposta
100	968	10112	6,31	0,10
200	2138	12089	-12,90	0,18
500	5561	9504	3,16	0,59
1000	8969	8815	-12,24	1,02
2000	23363	8683	13,88	2,69
5000	46726	7722	1,79	6,05



Concentração	Ároa	Área	Desvio(%	Respost
(nmol.L)	Alea	PI)	а
100	1058	8623	5,83	0,12
200	1970	9945	-11,45	0,20
500	5968	11148	-0,81	0,54
1000	9186	8932	-3,79	1,03
	2203			
2000	0	9648	7,42	2,28
	4406			
5000	0	8089	2,78	5,45



Concentração	Ároa	Área	Desvio(%	Respost
(nmol.L)	Леа	PI)	а
100	1022	8809	2,43	0,12
200	2155	10085	-2,15	0,21
500	5609	10889	-3,29	0,52
1000	9083	9951	-13,67	0,91
	2254			
2000	6	9616	11,53	2,34
	4509			
5000	2	8175	5,18	5,52



Concentraçao	Ároa	Area	Desvio(%	Respost
(nmol.L)	Alea	PI)	а
100	955	8351	0,13	0,11
200	2221	10057	1,01	0,22
500	5784	10962	-0,89	0,53
1000	9164	9672	-10,28	0,95
	2301			
2000	0	9773	12,17	2,35
	4602			
5000	0	8983	-2,16	5,12

Г



Concentração	Ároa	Área	Desvio(%	Respost
(nmol.L)	Alea	ΡI)	а
100	989	8597	2,12	0,12
200	2118	9702	-1,43	0,22
500	5698	10839	-4,01	0,53
1000	9092	9500	-12,32	0,96
	2308			
2000	6	9600	10,44	2,40
	4617			
5000	2	8071	5,19	5,72



ncentração	Ároa	Área	Desvio(%	Respost	
(nmol.L)	Alea	PI)	а	
100	999	8466	-1,33	0,12	
200	2280	9640	3,90	0,24	
500	6091	10938	0,55	0,56	
1000	9493	9735	-11,21	0,98	
	2254				
2000	5	9618	7,41	2,34	

0,66

5,48



0,0

Área	Área PI	Desvio(%)	Resposta
22745	19628	-7.93851	1.158804
50880	19432	14.39289	2.618361
80136	13648	6.707229	5.87163
104151	10112	-5.16597	10.29974
248211	11486	0.390921	21.60987
492819	9376	-1.85519	52.56175
821432	8218	-6.5317	99.95522
	Área 22745 50880 80136 104151 248211 492819 821432	ÁreaÁrea Pl227451962850880194328013613648104151101122482111148649281993768214328218	ÁreaÁrea PIDesvio(%)2274519628-7.93851508801943214.3928980136136486.70722910415110112-5.16597248211114860.3909214928199376-1.855198214328218-6.5317

SEROTONINA



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Desvio(%)	Resposta
10	23418	18990	-5.09375	1.233175
20	51658	20161	6.214631	2.562274
50	86342	13955	6.590831	6.187173
100	134501	10313	13.90695	13.04189
200	250568	12505	-12.1182	20.03743
500	493303	8890	-2.15134	55.48965
1000	821374	7827	-7.34916	104.9411



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Desvio(%)	Resposta
10	23272	18798	-5.91644	1.238004
20	51693	19792	8.555811	2.611813
50	85500	13827	7.394016	6.183554
100	134457	11043	7.358798	12.17577
200	269503	13367	-10.5621	20.16182
500	494050	8645	2.020454	57.14864
1000	826266	8103	-8.85077	101.9704



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Desvio(%)	Resposta
10	22908	19175	-7.01443	1.194681
20	51247	19751	9.025184	2.594653
50	85647	13484	10.73717	6.35175
100	124611	10010	9.834477	12.44865
200	262080	13017	-10.7562	20.13367
500	493220	8557	2.707987	57.63936
1000	820639	8564	-14.534	95.82426



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Desvio(%)	Resposta
10	23031	19445	-8.28257	1.184418
20	52032	20100	13.08682	2.588657
50	80910	13400	11.29095	6.03806
100	104394	10055	-2.75835	10.3823
200	249114	12089	-2.42989	20.60667
500	492185	9504	-1.26121	51.78714
1000	821335	8683	-9.64567	94.59116



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Desvio(%)	Resposta
10	23371	19839	-7.7247	1.178033
20	51768	19488	11.0513	2.656404
50	84948	13706	6.621281	6.19787
100	135575	10283	14.66467	13.18438
200	251338	11965	-8.32335	21.0061
500	496044	8803	-1.25386	56.34943
1000	824631	8512	-15.0351	96.87864



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	4893	8623	0.567436	10.21681
200	8749	9945	0.879739	-13.8858
500	24712	11148	2.21672	-12.4595
1000	39497	8932	4.421966	-12.4418
2000	99758	9648	10.33976	2.531646
5000	222377	8089	27.49128	9.12562
10000	541490	9459	57.24601	13.64451
20000	942071	9056	104.0273	3.267258

QUINURENINA



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	4708	8597	0.547633	7.511769
200	8821	9702	0.909194	-10.5351
500	22670	9839	2.304096	-9.10788
1000	39767	8500	4.678471	-7.65364
2000	98950	9600	10.30729	1.765376
5000	219592	8071	27.20753	7.471218
10000	522625	9343	55.9376	10.48524
20000	947340	9350	101.3198	0.063645



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	4760	8466	0.562249	7.913926
200	8797	9640	0.912552	-10.56
500	24310	10938	2.222527	-11.1477
1000	39595	8735	4.532914	-8.76891
2000	99061	9618	10.29954	4.027169
5000	221114	8232	26.8603	8.710089
10000	523435	9675	54.10181	9.542248
20000	939028	9482	99.03269	0.282737



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	4677	8369	0.558848	7.03948
200	8777	9296	0.94417	-7.19542
500	24013	11256	2.133351	-14.3817
1000	43266	9744	4.440271	-10.1512
2000	98506	9797	10.05471	2.165547
5000	230733	8458	27.27985	11.11271
10000	535038	9689	55.22118	12.53063
20000	951006	9802	97.02163	-1.11769



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	4713	8809	0.535021	9.175633
200	8612	10085	0.853941	-12.9263
500	24190	10889	2.221508	-9.44927
1000	42006	9951	4.221284	-13.9844
2000	98726	9616	10.26685	4.589144
5000	222421	8175	27.20746	10.85988
10000	543763	9692	56.10431	14.29978
20000	949500	9926	95.65787	-2.56005





Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	5538	21914	0.252715	3.244106
2	9851	19276	0.51105	-1.2295
5	24008	20908	1.148269	-13.9725
10	43974	15741	2.793596	3.071179
20	92365	18664	4.948832	-9.12941
50	189293	12402	15.2631	11.64615
100	254737	8466	30.08942	9.941808
200	509036	9640	52.80456	-3.57189



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	5588	22470	0.248687	3.258159
2	9633	18972	0.507748	-1.49377
5	23717	20685	1.14658	-14.3589
10	44139	15735	2.805148	2.844201
20	94586	17789	5.317106	-3.12398
50	188673	12705	14.8503	7.751688
100	255349	8386	30.44944	10.32919
200	505909	9664	52.34986	-5.20657



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
200	19724	2948050	0.006691	4.144768
500	52564	2921219	0.017994	-5.14993
1000	97310	2830501	0.034379	-14.0215
2000	261475	3034531	0.086167	3.915658
5000	670743	2936484	0.228417	8.507683
10000	1308998	2971741	0.440482	4.151445
20000	2531694	2687940	0.941871	11.06274
50000	3599065	1924592	1.870041	-11.8964

TRIPTOFANO







Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
200	21027	3056386	0.00688	3.644966
500	53796	2965621	0.01814	-5.92434
1000	103277	2818817	0.036638	-9.74127
2000	261754	3058488	0.085583	2.30739
5000	664958	2936411	0.226453	6.749975
10000	1351252	3012988	0.448476	5.249544
20000	2552827	2723240	0.937423	9.744745
50000	3589315	1910452	1.878778	-12,1135



ÁCIDO XANTURÊNICO

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
20	1866	3217676	0.00058	-3.76109
50	3439	2959359	0.001162	6.984306
100	5965	2812415	0.002121	9.896682
200	10017	2948050	0.003398	-7.49618
500	27605	2921219	0.00945	8.201326
1000	42734	2830501	0.015098	-12.6766

0.0


0,0]				
0,0 -				
0,0 -				
0,0 -				
0,0 -		•	• /	
0,0 -		/		
0,0 -				
0,0 -	~	-		

Concentração (nmol.L)	Área	Área Pl	Resposta	Desvio(%)
20	1913	3166680	0.000604	-2.10606
50	3460	3006589	0.001151	-0.09763
100	6379	2820961	0.002261	11.64453
200	10638	2978211	0.003572	-7.7706
500	30381	2946538	0.010311	11.76733
1000	44120	2832705	0.015575	-14.8693

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
20	1778	3159308	0.000563	-3.68758
50	3531	2986486	0.001182	5.142656
100	6483	2821080	0.002298	12.55682
200	11019	2974279	0.003705	-5.90688
500	30279	2955303	0.010246	7.969361
1000	45364	2833432	0.01601	-15.0228



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
20	1846	3107450	0.000594	-2.30361
50	3510	3002095	0.001169	1.592391
100	6242	2815430	0.002217	7.746446
200	11663	3056386	0.003816	-2.67904
500	30310	2965621	0.01022	8.54264
1000	45265	2818817	0.016058	-14.0021



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
20	1898	3203189	0.000593	-2.58201
50	3449	2983800	0.001156	4.475814
100	6071	2812323	0.002159	10.54052
200	9854	2976506	0.003311	-11.2449
500	28949	2933455	0.009869	11.75757
1000	43947	2838163	0.015484	-11.4715



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
20	1922	3121969	0.000616	-1.79616
50	3593	3008183	0.001194	0.204863
100	6622	2837666	0.002334	10.06029
200	11973	2998781	0.003993	-1.31158
500	30707	2970588	0.010337	6.258402
1000	45737	2722954	0.016797	-12.8717



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	2661	10628	0.250376	-3.71502
2	8968	17763	0.50487	12.00101
5	13861	14096	0.983329	-7.17683
10	35395	19445	1.820262	-11.587
20	81580	20100	4.058706	0.37445
50	161774	14400	11.23431	12.17103
100	223685	10055	22.24615	11.34825
200	417851	12089	34.56456	-13.416

TRIPTAMINA



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	2827	11776	0.240065	-2.97381
2	9030	18514	0.487739	12.00481
5	18598	20982	0.886379	-14.3213
10	36089	18990	1.900421	-5.1704
20	81057	20161	4.020485	1.762955
50	162744	14955	10.88225	11.0661
100	223817	10313	21.70241	11.00837
200	423189	12505	33.84158	-13.3769



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	2767	11792	0.234651	-3.16464
2	9142	18752	0.487521	12.2797
5	19612	21475	0.913248	-12.0815
10	36204	19839	1.82489	-9.99406
20	80791	19488	4.145679	3.61405
50	162417	14706	11.04427	11.13463
100	222770	10283	21.66391	9.206728
200	422194	11965	35.28575	-10.9949



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	2767	12120	0.2283	-3.03979
2	9063	18954	0.478158	11.4281
5	20379	22659	0.899378	-12.9806
10	36566	18798	1.945207	-3.79395
20	80235	19792	4.053911	1.228811
50	161827	14827	10.91435	9.627075
100	223449	10043	22.24923	11.92678
200	420654	12367	34.01423	-14.3964



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	2850	11725	0.24307	-7.65634
2	9006	18130	0.496746	11.88913
5	21790	18992	1.147325	12.17147
10	36223	19934	1.817147	-9.20939
20	80458	19945	4.033993	2.825082
50	162834	15476	10.52171	8.358525
100	224965	12052	18.6662	-3.62242
200	427652	12971	32.96986	-14.7561



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	2906	11485	0.253026	-5.62689
2	8864	18332	0.483526	7.618061
5	21876	19246	1.136652	11.54059
10	35402	19175	1.846258	-7.02145
20	78931	19751	3.996304	2.858163
50	162111	15484	10.46958	9.028601
100	220928	12010	18.39534	-3.92695
200	425606	13017	32.69617	-14,4702

ÁCIDO QUINURÊNICO



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	1272	3095877	0.000411	-3.61172
20	2440	3203189	0.000762	7.463041
50	4733	2983800	0.001586	-1.30591
100	9266	2812323	0.003295	7.068426
200	15834	2976506	0.00532	-12.2618
500	44941	2933455	0.01532	2.666218



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	1300	3115062	0.000417	-0.66299
20	2279	3166680	0.00072	1.619364
50	4679	3006589	0.001556	-1.85621
100	9326	2820961	0.003306	9.199625
200	15995	2978211	0.005371	-9.9241
500	44287	2946538	0.01503	2.418726



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	1270	3124661	0.000406	-4.78795
20	2441	3121969	0.000782	10.81045
50	4636	3008183	0.001541	-4.54779
100	9140	2837666	0.003221	4.285946
200	17036	2998781	0.005681	-6.44258
500	44521	2970588	0.014987	0.091611



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	1124	3105627	0.000362	-5.87824
20	2385	3107450	0.000768	13.3332
50	4593	3002095	0.00153	-4.83526
100	9390	2815430	0.003335	6.57781
200	17246	3056386	0.005643	-9.00816
500	45546	2965621	0.015358	-0.10401



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	1340	3114738	0.00043	0.793367
20	2245	3180834	0.000706	-2.73648
50	4789	2999544	0.001597	-0.49688
100	9419	2807285	0.003355	9.56867
200	16012	2984505	0.005365	-11.0346
500	44884	2931335	0.015312	3.25112



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	1165	3077344	0.000379	-3.17505
20	2297	3159308	0.000727	7.079949
50	4575	2986486	0.001532	-2.96986
100	9484	2821080	0.003362	10.12896
200	16139	2974279	0.005426	-10.1821
500	44155	2955303	0.014941	-0.00044



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	2837	961551	0.00295	2.354942
2	7751	1463134	0.005298	-6.93562
5	15517	991843	0.015645	11.08862
10	37693	1493158	0.025244	-10.1936
20	84434	1518756	0.055594	-0.93261
50	182814	1370079	0.133433	-4.8075
100	371824	1307151	0.284454	1.499441
200	760648	1257742	0.604773	7.914823

DIMETILTRIPTAMINA



0,7				
0,6 -				
0,5 -				
0,4 -				
0,3 -				
0,2 -				
0,1 -				
	1	1	I	

Concentração (nmol.L)	Área	Área Pl	Resposta	Desvio(%)
1	2767	985278	0.002808	3.442908
2	7897	1483070	0.005325	-2.41035
5	17511	1377375	0.012713	-7.09408
10	37154	1500042	0.024769	-9.59922
20	84325	1513717	0.055707	1.593891
50	185646	1385242	0.134017	-2.26662
100	374066	1299422	0.287871	4.954346
200	769169	1258840	0.611014	11.37824

Concentração (nmol.L)	Area	Área Pl	Resposta	Desvio(%)
1	2781	978961	0.002841	3.663758
2	7993	1488989	0.005368	-1.64531
5	17901	1479479	0.0121	-11.0929
10	37924	1509527	0.025123	-7.59867
20	82573	1503177	0.054932	1.073684
50	186181	1389207	0.13402	-1.33674
100	375664	1313779	0.285942	5.263418
200	767840	1265621	0.60669	11.67537



0,1		
0,6 -		
0,5 -		
0,4 -		
0,3 -		
0,2 -		
0,1 -		

Concentração (nmol.L)	Área	Área Pl	Resposta	Desvio(%)
1	2814	991127	0.002839	4.166086
2	7804	1480186	0.005272	-2.2726
5	18036	1531079	0.01178	-12.0769
10	36651	1495244	0.024512	-8.26974
20	80690	1486533	0.054281	1.710523
50	186021	1386116	0.134203	0.656737
100	375808	1314526	0.285889	7.239616
200	758141	1306370	0.580342	8.858075

Concentração (nmol.L)	Area	Área Pl	Resposta	Desvio(%)
1	2846	975310	0.002918	3.3832
2	7726	1466143	0.00527	-5.62722
5	16655	1178104	0.014137	2.127746
10	36819	1489012	0.024727	-10.4941
20	83926	1510544	0.05556	0.715242
50	184714	1381309	0.133724	-2.96658
100	373281	1316386	0.283565	2.909451
200	761928	1257541	0.605887	9.95665



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	2793	977019	0.002859	2.450387
2	7915	1480960	0.005345	-3.84294
5	18246	1282044	0.014232	2.720322
10	37497	1506728	0.024886	-10.1234
20	82333	1515792	0.054317	-1.86518
50	187571	1386989	0.135236	-2.24033
100	374823	1321088	0.283723	2.558835
200	765987	1254730	0.61048	10.34177

ÁCIDO-5-HIDRÓXIINDOLACÉTICO



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	939	10112	0.09286	-2.21758
200	2320	11486	0.201985	3.9326
500	4555	9376	0.485815	-1.1628
1000	8922	8673	1.02871	4.184559
2000	16780	8218	2.041859	3.194345
5000	37256	7692	4.843474	-2.19821
10000	82073	8519	9.634112	-2.77228
20000	158186	8221	19.2417	-2.92661



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	888	10313	0.086105	0.178519
200	2199	12505	0.17585	-3.21247
500	4519	8836	0.511431	8.562209
1000	8048	8890	0.905287	-4.73062
2000	15663	7827	2.00115	4.65743
5000	38106	7948	4.794414	0.001463
10000	76708	8328	9.210855	-4.03776
20000	152617	8061	18.93276	-1.43137



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	976	10043	0.097182	-1.5148
200	2575	13367	0.192639	-1.91557
500	4817	9039	0.532913	8.876494
1000	8961	8645	1.036553	5.977337
2000	16483	8103	2.034185	4.034102
5000	39032	7877	4.955186	1.396717
10000	77859	8706	8.943143	-8.49161
20000	150562	8405	17.91338	-8.34812



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	900	10010	0.08991	-4.20973
200	2572	13017	0.197588	3.9831
500	4543	8716	0.521225	9.024756
1000	8747	8557	1.022204	6.703097
2000	15812	8564	1.846333	-3.72057
5000	38820	7989	4.859181	1.285975
10000	78572	8840	8.888235	-7.38333
20000	153364	8473	18.10032	-5.70707



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	933	10055	0.09279	-1.9786
200	2328	12089	0.192572	1.511017
500	4715	9504	0.496107	4.486369
1000	8883	8815	1.007714	6.079575
2000	15477	8683	1.782448	-6.19759
5000	38436	7722	4.977467	4.763276
10000	79371	8644	9.182207	-3.37191
20000	153356	8517	18.00587	-5.26028



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	1030	10283	0.100165	-0.6424
200	2336	11965	0.195236	-0.39431
500	4711	9160	0.514301	6.865742
1000	8018	8803	0.910826	-4.91977
2000	15908	8512	1.868891	-2.14662
5000	39437	7939	4.967502	4.231389
10000	79732	8541	9.335207	-2.00988
20000	153575	8145	18.85513	-1.01061



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	3796	1493158	0.002542	0.537407
20	9901	1518756	0.006519	1.372384
50	23776	1370079	0.017354	-3.76052
100	47820	1307151	0.036583	-2.45945
200	86651	1257742	0.068894	-9.70991
500	236388	1071603	0.220593	14.09023

AMK



0,3				
0,2 -				<u> </u>
0,2 -				
0,1 -				
		/		
0,1 -	/			

Concentração (nmol.L)	Área	Área Pl	Resposta	Desvio(%)
10	4122	1500042	0.002748	2.189407
20	9619	1513717	0.006355	-2.41608
50	24076	1385242	0.01738	-4.11776
100	48556	1299422	0.037367	-0.53264
200	89639	1258840	0.071208	-6.64653
500	231320	1075397	0.215102	11.53285

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	4171	1509527	0.002763	2.585117
20	9280	1503177	0.006174	-2.44491
50	23614	1389207	0.016998	-2.2444
100	41525	1313779	0.031607	-11.4882
200	91551	1265621	0.072337	-0.49513
500	225052	1074830	0.209384	14.16277



	◆ y = -0,00142794	467+ 0,0003917 x ;	; 1/x ² weighted; R	^2 = 0,9906599	
0,3					•
0,2 -					/
0,2 -					
0,1 -					
0,1 -		•			
0,0	100	200	300	400	50
0.1					

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	3973	1495244	0.002657	0.426834
20	9669	1486533	0.006504	2.091857
50	23532	1386116	0.016977	-2.67708
100	41759	1314526	0.031767	-11.4507
200	95200	1306370	0.072874	-0.29608
500	220027	1065483	0.206504	11.95858

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	3757	1489012	0.002523	0.87047
20	9774	1510544	0.006471	0.822866
50	24017	1381309	0.017387	-3.93119
100	47776	1316386	0.036293	-3.69861
200	88291	1257541	0.070209	-8.55605
500	239605	1075793	0.222724	14.45087



Concentração (nmol.L)	Área	Área Pl	Resposta	Desvio(%)
10	3945	1506728	0.002618	1.878181
20	9500	1515792	0.006267	-2.25364
50	24440	1386989	0.017621	-2.64823
100	49387	1321088	0.037384	-0.62459
200	88610	1254730	0.070621	-7.67865
500	231332	1072791	0.215636	11.33331



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	1136	1479498	0.000768	-3.08584
2	2416	1546084	0.001563	6.372391
5	5039	1481685	0.003401	-3.87482
10	9206	1216591	0.007567	8.776494
20	20691	1516584	0.013643	-1.33811
50	44889	1400090	0.032062	-6.85308

AFMK



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	1061	1487466	0.000713	-5.9204
2	2514	1550974	0.001621	12.69542
5	4902	1470787	0.003333	-5.38501
10	9377	1223417	0.007665	9.976606
20	20075	1502613	0.01336	-3.81189
50	45214	1412075	0.03202	-7.53319



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	1247	1606417	0.000776	-1.85085
2	2356	1542813	0.001527	4.152259
5	4880	1471964	0.003315	-5.86792
10	9503	1230606	0.007722	11.72146
20	20514	1524589	0.013455	-2.08221
50	45509	1417034	0.032116	-6.07865



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	1275	1652130	0.000772	-2.35138
2	2391	1541278	0.001551	5.919591
5	4790	1483987	0.003228	-8.5189
10	9562	1231102	0.007767	12.22999
20	21575	1562957	0.013804	0.328685
50	44798	1416151	0.031634	-7.63572



Concentração (nmol.L)	Área	Área Pl	Resposta	Desvio(%)
1	1037	1477786	0.000702	-5.27038
2	2455	1548805	0.001585	10.89815
5	4936	1477755	0.00334	-5.14854
10	9502	1209296	0.007857	12.40361
20	20235	1514381	0.013362	-4.20936
50	44939	1413411	0.031795	-8.65492



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	1067	1527863	0.000698	-3.39509
2	2340	1544785	0.001515	7.660673
5	4758	1465872	0.003246	-6.59181
10	9446	1224706	0.007713	11.66006
20	19889	1493380	0.013318	-3.41645
50	45624	1409152	0.032377	-5.9389

◆y = 0,0000172989+ 0,0000162 x ; 1/x^2 weighted; R^2 = 0,9957019

ÁCIDO ANTRANÍLICO



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	4667	2812415	0.001659	1.365988
200	9285	2948050	0.00315	-3.32591
500	25617	2921219	0.008769	8.049202
1000	41515	2830501	0.014667	-9.56965
2000	95519	3034531	0.031477	-2.90107
5000	251072	2936484	0.085501	5.5353
10000	472440	2971741	0.158978	-1.87641
20000	906598	2687940	0.337284	4.094528

129



0,4		
0,4 -		٨
0,3 -		
0,3 -		
0,2 -		
0,2 -		
0,1 -		
0,1 - 0,1 -		

Concentração (nmol.L)	Área	Área Pl	Resposta	Desvio(%)
100	4766	2812323	0.001695	1.754224
200	9374	2976506	0.003149	-3.94756
500	25211	2933455	0.008594	6.060388
1000	41706	2838163	0.014695	-9.07904
2000	94652	3047472	0.031059	-3.71818
5000	250019	2916050	0.085739	6.437871
10000	477602	2979884	0.160275	-0.48514
20000	893516	2689957	0.332167	3.140047

Concentração (nmol.L)	Área	Área Pl	Resposta	Desvio(%)
100	4611	2807285	0.001643	-0.08596
200	9711	2984505	0.003254	-0.31169
500	25192	2931335	0.008594	5.804096
1000	40958	2843185	0.014406	-11.2236
2000	95471	3057779	0.031222	-3.70855
5000	252161	2937749	0.085835	5.939336
10000	472425	2939846	0.160697	-0.81896
20000	899987	2688947	0.334699	3.294682



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	4871	2820961	0.001727	2.805689
200	9150	2978211	0.003072	-6.80841
500	25952	2946538	0.008808	8.522727
1000	41330	2832705	0.01459	-9.82143
2000	96874	3051782	0.031743	-1.64014
5000	247061	2910759	0.084879	5.350316
10000	485652	2968204	0.163618	1.581732
20000	875241	2698010	0.324402	0.723877



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	4927	2821080	0.001746	3.086343
200	9358	2974279	0.003146	-6.29374
500	25783	2955303	0.008724	4.68742
1000	43217	2833432	0.015253	-8.32972
2000	97903	3046334	0.032138	-3.30508
5000	249512	2923804	0.085338	2.774555
10000	483200	2700156	0.178953	7.781544
20000	889337	2688059	0.330847	-0.35783



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	4916	2837666	0.001732	0.580031
200	9892	2998781	0.003299	-1.3685
500	25530	2970588	0.008594	4.830184
1000	41693	2822954	0.014769	-9.46748
2000	97568	3083643	0.03164	-2.66208
5000	251253	2926759	0.085847	5.856571
10000	491864	2986423	0.1647	1.603106
20000	882180	2714483	0.32499	0.273781



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	16056	961551	0.016698	0.564782
2	46646	1463134	0.031881	-0.11048
5	75000	991843	0.075617	-2.88463
10	229648	1493158	0.1538	-0.35241
20	474159	1518756	0.312202	1.578677
50	1062752	1370079	0.775687	1.205398

MELATONINA





Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	15920	985278	0.016158	0.110833
2	47167	1483070	0.031804	1.404803
5	101013	1377375	0.073337	-4.91259
10	231862	1500042	0.15457	0.865101
20	467540	1513717	0.308869	1.073359
50	1071828	1385242	0.773748	1.458712

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	15793	978961	0.016132	0.387946
2	46782	1488989	0.031419	0.526944
5	109230	1479479	0.07383	-3.92998
10	231864	1509527	0.1536	0.567025
20	462286	1503177	0.307539	0.970984
50	1071584	1389207	0.771364	1.477818





Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	16143	991127	0.016288	0.435048
2	46749	1480186	0.031583	0.542835
5	112551	1531079	0.073511	-4.60321
10	232176	1495244	0.155276	1.502766
20	456601	1486533	0.307158	0.723089
50	1069395	1386116	0.771505	1.400306

Concentração (nmol.L)	Área	Área Pl	Resposta	Desvio(%)
1	15738	975310	0.016136	-0.19424
2	46840	1466143	0.031948	1.400322
5	88826	1178104	0.075397	-2.83385
10	230191	1489012	0.154593	0.170983
20	467207	1510544	0.309297	0.472444
50	1071811	1381309	0.775939	0.982828



Concentração (nmol.L)	Área	Área Pl	Resposta	Desvio(%)
1	15976	977019	0.016352	0.183285
2	47236	1480960	0.031896	1.394185
5	93314	1282044	0.072785	-5.45918
10	233722	1506728	0.155119	1.619233
20	461677	1515792	0.304578	0.139003
50	1074516	1386989	0.774711	2.123076

ÁCIDO-3-INDOLACÉTICO



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
50	1527	1370079	0.001115	6.293403
100	2675	1307151	0.002046	-9.27665
200	5442	1257742	0.004327	-8.6632
500	14083	1071603	0.013142	7.624981
1000	21364	965752	0.022122	-9.97933
2000	42167	746143	0.056513	14.34839



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
50	1481	1385242	0.001069	4.945362
100	2786	1299422	0.002144	-6.1849
200	5489	1258840	0.00436	-10.4707
500	14654	1075397	0.013627	7.090446
1000	21774	954510	0.022812	-11.1274
2000	44694	751040	0.059509	15.00893



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
50	1407	1389207	0.001013	4.507785
100	2787	1313779	0.002121	-5.2728
200	5473	1265621	0.004324	-10.4334
500	15126	1074830	0.014073	10.52829
1000	21524	962025	0.022374	-12.9323
2000	44318	751587	0.058966	13.63393



0,1		٠
0,1 -		
0,0 -		
0,0 -		
0,0 -	•	
0,0 -		

Concentração (nmol.L)	Area	Area PI	Resposta	Desvio(%)
50	1553	1388209	0.001119	5.647016
100	2736	1310272	0.002088	-9.60252
200	6081	1314033	0.004628	-5.58379
500	14665	1067848	0.013733	8.351681
1000	21216	956056	0.022191	-13.0414
2000	44018	750159	0.058678	14.19063

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
50	1410	1381309	0.001021	4.933728
100	2716	1316386	0.002063	-6.97074
200	5386	1257541	0.004283	-10.2998
500	15114	1075793	0.014049	11.8817
1000	21774	960653	0.022666	-10.5313
2000	42414	752172	0.056389	10.34305



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
50	1383	1386989	0.000997	2.964338
100	2939	1321088	0.002225	-2.36905
200	5648	1254730	0.004501	-8.38969
500	14921	1072791	0.013909	7.375054
1000	21818	950657	0.02295	-12.3205
2000	44840	749515	0.059825	13.15349

7.2. Curvas em matriz do teste de seletividade



ÁCIDO NICOTÍNICO

60,0			
50,0 -			/
40,0 -			
30,0 -			
20,0 -			
10,0 -			
0.0	 1000	4500	

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	3381	18798	108.343	8.343022
20	6206	18792	85.91876	-14.0812
50	12622	12827	89.57277	-10.4272
100	25778	10043	111.6109	11.61088
200	50741	12367	88.23453	-11.7655
500	130166	10039	110.1349	10.13493
1000	194545	8645	95.33636	-4.66364

Concentração (nmol.L)	Area	Area PI	Resposta	Desvio(%)
10	3271	19839	0.164877	6.681113
20	6485	19488	0.332769	-10.5953
50	12992	13706	0.947906	-11.384
100	25952	10283	2.523777	12.00935
200	48853	11965	4.082992	-10.5024
500	130833	10160	12.87726	11.36158
1000	195093	8803	22.1621	-4.43039
2000	422733	8512	49.66318	6.858811



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	3157	19175	0.164641	7.740613
20	6164	18751	0.328729	-12.4797
50	12934	13484	0.959211	-13.2738
100	26194	10010	2.616783	11.34793
200	51272	11217	4.570919	-4.25188
500	133492	9716	13.7394	13.50774
1000	197039	8557	23.02664	-5.15476
2000	427467	8564	49.91441	2.562302



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	3224	19934	0.161734	8.595828
20	6181	19945	0.309902	-14.8326
50	13049	13476	0.968314	-11.0636
100	26023	10052	2.588838	11.9923
200	52122	11971	4.354022	-7.22795
500	130488	9933	13.13682	10.30121
1000	198302	8681	22.84322	-4.4047
2000	427232	8363	51.08597	6.638683



3.942106

13.1344

23.50218

-13.254

13.76712

1.47348

50.33202 8.431859



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	3263	19627	0.166251	8.057776
20	5924	18020	0.328746	-11.9922
50	12552	13519	0.928471	-14.6342
100	26423	10248	2.578357	11.68345
200	52366	12636	4.144191	-11.4156
500	131866	9855	13.38062	12.68985
1000	198300	8568	23.14426	-2.82217
2000	424098	8193	51.76346	8.433674

ÁCIDO QUINOLÍNICO



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	1013	8369	0,121042	2,365068
200	2032	9296	0,218589	-2,00554
500	5744	11256	0,510306	-4,8051
1000	9244	9744	0,948686	-10,3274
2000	22861	9797	2,333469	11,29099
5000	45722	8458	5,40577	3,491351



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	942	8491	0,110941	-1,26524
200	2114	9302	0,227263	4,298415
500	5623	10678	0,526597	-1,73855
1000	8959	9423	0,950759	-10,8086
2000	22857	9648	2,369092	11,57402
5000	45714	8808	5,190054	-2,08436



Concentração (nmol.L)	Area	Area PI	Resposta	Desvio(%)
100	988	8475	0,116578	-2,45005
200	2209	9326	0,236865	6,923727
500	5637	10640	0,529793	-0,58765
1000	8949	9672	0,925248	-12,0598
2000	22077	10123	2,180875	4,669486
5000	44154	8227	5,366962	3,476364



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	1067	8276	0,128927	0,531378
200	2106	9096	0,23153	-0,64651
500	5824	10719	0,543334	-0,58892
1000	9161	8704	1,052505	-1,57469
2000	22531	10563	2,133011	0,906601
5000	45062	8467	5,322074	1,391489



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	1069	8351	0,128009	-3,19188
200	2238	8972	0,249443	7,249811
500	5870	10883	0,539373	-0,90108
1000	8846	8529	1,037167	-2,20534
2000	21599	10384	2,080027	-0,56673
5000	43198	8361	5,166607	-0,39766



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	1004	8257	0,121594	-1,0081
200	2063	8629	0,239078	4,569891
500	5607	10983	0,510516	-7,2741
1000	8903	8248	1,079413	-0,29963
2000	22446	10008	2,242806	4,38762
5000	44892	8423	5,329693	-0,36221
SEROTONINA



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	25445	15280	1,665249	-5,02775
20	49580	15654	3,167242	10,59146
50	85890	13819	6,215356	-4,53753
100	112767	8491	13,28077	7,101052
200	224443	9302	24,12847	-0,87351
500	560538	8932	62,75616	4,567375
1000	1017614	9648	105,4741	-11,8209



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	25473	15430	1,650875	-1,24132
20	53170	19421	2,737758	-3,92477
50	82637	11613	7,115905	13,66961
100	115422	8809	13,10274	8,277391
200	225784	9945	22,70327	-4,61443
500	564507	9672	58,36507	-0,56008
1000	1034556	10008	103,3729	-11,6065



	▼y = 0,45624995	3+ 0,1231564 X , 1	/x^2 weighted, K^	2 = 0,9670525	
20,0					
00,0 -					/
80,0 -					
60,0 -					
40,0 -					
20,0 -					
0,0		I	1	I	

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	26311	15741	1,671495	0,935127
20	52486	19815	2,648801	-7,00042
50	86535	12826	6,746842	8,537911
100	120003	8997	13,33811	11,63888
200	227007	10057	22,57204	-3,99486
500	561118	9735	57,63924	-0,55349
1000	1020449	9773	104,4151	-9,56337

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	25679	15311	1,67716	-1,02906
20	52183	18664	2,795917	-5,09509
50	86222	11581	7,445126	13,46162
100	120003	8597	13,95871	9,618642
200	225093	8629	26,08564	4,042402
500	562644	9744	57,74261	-6,9745
1000	1022824	9618	106,3448	-14,0241





Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	25461	15167	1,67871	-7,244
20	47702	14749	3,234253	12,03062
50	84389	12638	6,677401	2,940298
100	113847	8475	13,43327	8,497278
200	226599	9326	24,29756	0,101985
500	565157	9951	56,79399	-5,09795
1000	1016849	9616	105,7455	-11,2284

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	25935	15361	1,688367	-0,70353
20	52967	19338	2,739011	-5,10873
50	84150	12011	7,006078	11,45616
100	114848	8351	13,7526	13,83209
200	226072	10085	22,41666	-5,77466
500	561686	9500	59,12484	0,919496
1000	1034975	10384	99,67017	-14,6209

QUINURAMINA



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	4837	20422	0,236852	-3,79525
2	11422	19117	0,597479	11,31066
5	24953	20097	1,241628	-10,3148
10	51849	18513	2,800681	-0,50522
20	91489	15654	5,844449	3,096627
50	183019	11658	15,699	10,32841
100	214811	8519	25,21552	-11,4759
200	513228	8881	57.78944	1.355544



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	4921	19499	0,252372	-1,94117
2	11269	19376	0,581596	6,919408
5	25378	19913	1,274444	-8,50069
10	51203	18754	2,730244	-3,05341
20	90893	14749	6,162655	8,828048
50	182131	12042	15,12465	6,56549
100	215483	8276	26,0371	-8,34084
200	514587	9096	56,57289	-0,47696





Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	4773	19203	0,248555	-4,27428
2	11851	19279	0,61471	11,65133
5	24766	19033	1,301214	-7,50076
10	51273	19125	2,680941	-5,67751
20	71193	11371	6,260927	9,528706
50	182757	11826	15,45383	7,871854
100	214968	8508	25,26657	-11,8742
200	509858	8862	57,53306	0,274814



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	4633	19386	0,238987	-4,47487
2	11751	18792	0,625319	12,45122
5	24996	19022	1,314057	-8,88977
10	51665	18971	2,723367	-7,24907
20	70410	10224	6,886737	16,08817
50	183762	11968	15,35445	3,149603
100	215472	8213	26,23548	-11,9861
200	512829	8516	60,21947	0,910738



Concentração (nmol.L)	Área	Área Pl	Resposta	Desvio(%)
1	4612	19414	0,237561	-4,99138
2	11947	19239	0,620978	12,28456
5	25079	18933	1,324618	-7,53283
10	51122	18090	2,825981	-3,03394
20	70333	10555	6,663477	13,31935
50	183328	11581	15,83007	7,277299
100	212626	8288	25,65468	-13,163
200	514953	9085	56,68167	-4,15994

TRIPTOFANO







ÁCIDO XANTURÊNICO



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
20	1413	2895526	0,000488	-3,49227
50	3341	2979591	0,001121	10,56907
100	5257	2941559	0,001787	-6,88292
200	11425	2989682	0,003821	4,35198
500	30425	3110379	0,009782	9,471353
1000	47454	3119506	0,015212	-14,4106



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
20	1244	2796513	0,000445	-2,79882
50	3177	3001907	0,001058	9,803896
100	4962	2926457	0,001696	-8,26346
200	10946	2984827	0,003667	2,852329
500	30278	3115002	0,00972	11,116
1000	47267	3114721	0,015175	-12,9085



	◆ y = 0,000046	122+ 0,0000177 x ;	1/x^2 weighted; R/	2 = 0,9840882	
),0]					
0,0 -					/•
0,0 -					
0,0 -					
0,0 -			. /		
0,0 -					
0,0 -					
0,0 -					
0,0 -	2				
0,0					
0	200	400	600	800	1000

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
20	1323	2812173	0,00047	0,170843
50	2825	3004695	0,00094	-3,33641
100	5315	2940816	0,001807	0,568313
200	11294	2981277	0,003788	9,95247
500	27397	3108956	0,008812	4,510789
1000	45906	3122794	0,0147	-12,2746

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
20	1136	2801937	0,000405	1,500508
50	2520	2997593	0,000841	-10,2201
100	6079	2928289	0,002076	14,6799
200	10222	2980868	0,003429	-4,43275
500	29963	3071018	0,009757	9,724041
1000	49505	3133359	0,015799	-10,9988





Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
20	1369	2886535	0,000474	-1,81389
50	3036	2996410	0,001013	0,517784
100	5980	2927310	0,002043	8,759949
200	11141	2991945	0,003724	2,130929
500	29501	3115352	0,00947	6,14659
1000	47591	3142465	0,015144	-14,6828

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
20	1216	2787501	0,000436	-3,92173
50	3172	2985247	0,001063	14,34956
100	4820	2908100	0,001657	-6,77182
200	10154	2989410	0,003397	-0,68236
500	27977	3118273	0,008972	7,306408
1000	47441	3118242	0,015214	-8,51608

TRIPTAMINA



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	4117	19499	0,211139	-0,50227
2	9617	19376	0,496336	5,481769
5	22467	19913	1,128258	-8,41139
10	43411	18754	2,31476	-7,83265
20	76189	14749	5,165706	1,796649
50	156267	12042	12,97683	1,776417
100	266887	9276	28,77178	12,62093
200	442121	9096	48,60609	-4,92948



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	4270	19937	0,214175	-2,44612
2	10233	19182	0,533469	9,764911
5	22440	19445	1,154024	-8,68146
10	44440	18656	2,382075	-7,42703
20	76391	15056	5,073791	-2,29941
50	156672	11613	13,49109	3,391305
100	266818	9257	28,82338	10,26766
200	439795	8629	50,96709	-2,56976



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	4278	19386	0,220675	Deviation
2	10041	18792	0,534323	-1,61565
5	22072	19022	1,160341	8,378
10	43844	18971	2,311106	-9,3967
20	69242	12224	5,664431	-11,2682
50	154680	11968	12,92447	7,643533
100	268883	9213	29,18517	-2,1435
200	442407	8516	51,95009	10,29654



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	4053	19414	0,208767	-1,93385
2	10011	19239	0,520349	7,169937
5	22396	18933	1,182908	-7,68239
10	43923	18090	2,428027	-7,37691
20	68654	11555	5,941497	11,86793
50	154617	11581	13,35092	0,046898
100	267879	9288	28,84141	7,829561
200	438109	9085	48,22334	-9,92129



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	4278	20488	0,208805	-3,14106
2	10102	18735	0,539205	11,23985
5	22179	19508	1,136918	-10,0529
10	43781	19134	2,288126	-11,2565
20	71084	12100	5,874711	12,55425
50	155577	12011	12,95288	-1,15471
100	267004	9351	28,55352	8,737653
200	438849	8972	48,91317	-6,9266



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	4186	19203	0,217987	-0,56763
2	9806	19279	0,508636	4,763495
5	22329	19033	1,173173	-7,75088
10	44705	19125	2,337516	-9,77149
20	67836	11371	5,965702	13,82995
50	155175	11826	13,12151	-0,2573
100	264690	9508	27,83866	5,618173
200	440079	8862	49,65911	-5,86428

KA



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	1112	2938164	0,000378	-4,45746
20	2224	2895526	0,000768	11,2263
50	4615	2979591	0,001549	-4,64376
100	9265	2941559	0,00315	-0,1779
200	18556	2989682	0,006207	-0,30084
500	47487	3110379	0,015267	-1,09369



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	1159	2966077	0,000391	4,872349
20	1706	2787501	0,000612	-10,4387
50	4651	2985247	0,001558	-0,68706
100	9016	2929846	0,003077	0,639685
200	18888	2968562	0,006363	5,443698
500	46239	3097142	0,01493	-0,32659





0 100	200	300	400	500
Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	1261	2934038	0,00043	1,421319
20	2045	2886535	0,000708	-0,9076
50	4373	2996410	0,001459	-8,21365
100	9109	2927310	0,003112	3,265309
200	18724	2991945	0,006258	6,257755
500	44361	3115352	0,014239	-2,07088

0,0 -

0,0

0,0

0,0

0,0

0,0

0,0

0,0

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	1222	2971034	0,000411	2,487215
20	1897	2812173	0,000675	-4,5848
50	4642	3004695	0,001545	-3,42129
100	9295	2940816	0,003161	2,509889
200	18912	2981277	0,006344	4,659356
500	45827	3108956	0,01474	-1,78238





200		-0,1				
	Г		6	á si	-	
	_	Concentração (nmol.L)	Area	Area PI	Resposta	Desvio(%)
esvio(%))	1	3129	1511621	0,00207	-2,59755
2,19033		2	8662	1561425	0,005547	9,414473
,713348		5	18917	1504518	0,012573	-7,16849
5,05608		10	38302	1469258	0,026069	-6,46152
6,24253	_	20	77912	1380921	0,05642	-0,24117
,235518	_	50	186974	1399485	0,133602	-6,19676
7,36481		100	402197	1297757	0,309917	8,46628
,010315		200	769094	1282835	0,599527	4,795275
004050	1 -			-		

50

◆ y = -0,0007195455+ 0,0028639 x ; 1/x^2 weighted; R^2 = 0,9939373

100

150

0,7

0,6

0,5

0,4

0,3

0,2

0,1

0,0

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	3015	1495549	0,002016	-2,19033
2	8450	1567358	0,005391	7,713348
5	19312	1504968	0,012832	-5,05608
10	38061	1457454	0,026115	-6,24253
20	79078	1393732	0,056738	0,235518
50	185340	1402744	0,132127	-7,36481
100	405706	1312258	0,309166	8,010315
200	765787	1273681	0,601239	4,894258



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	3074	1510077	-2,53416	0,002036
2	8774	1588512	9,242118	0,005523
5	19214	1522766	-7,07054	0,012618
10	38526	1482547	-7,14897	0,025986
20	76347	1324645	1,334363	0,057636
50	188762	1410063	-6,56413	0,133868
100	400218	1284270	8,398348	0,311631
200	765363	1274256	4.338741	0.600635



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	3229	1497819	0,002156	-1,80074
2	8710	1583500	0,0055	7,112474
5	19775	1525516	0,012963	-5,38165
10	38768	1477003	0,026248	-6,60584
20	75684	1327509	0,057012	0,057293
50	189165	1411700	0,133998	-6,56468
100	406284	1301366	0,312198	8,53474
200	772619	1282071	0,602634	4,642963



200

9,289018

4,836064

408086 1299734 0,313977

0,60304

768819 1274906

100

200

1	65	
_ 1	\mathbf{U}	

1291748 0.311351

768906 1278926 0,601212

7,904114

4,062923





Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	829	8257	0,1004	-1,10478
200	1691	8629	0,195967	-0,73098
500	5599	10983	0,509788	5,148285
1000	8186	8248	0,992483	2,902072
2000	19436	10008	1,942046	0,953869
5000	44361	8423	5,266651	9,709135
10000	71277	7666	9,297809	-3,1148
20000	128619	7776	16,54051	-13,7996



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	744	8508	0,087447	-2,34833
200	1676	8862	0,189122	1,322213
500	5622	11201	0,501919	5,129748
1000	8911	8642	1,031127	7,212497
2000	19144	10216	1,873923	-2,87887
5000	43130	8097	5,326664	10,15661
10000	69295	7566	9,158736	-5,35052
20000	130467	7768	16,79544	-13,2458



Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
853	8276	0,103069	1,836396
1648	9096	0,181179	-7,95859
5587	10719	0,521224	8,427694
8893	8704	1,021714	6,913664
18993	10563	1,798069	-5,66949
42907	8467	5,067556	6,585265
69534	7704	9,025701	-5,02953
134079	7434	18,03592	-5,0776
	Área 853 1648 5587 8893 18993 42907 69534 134079	ÁreaÁrea Pl8538276164890965587107198893870418993105634290784676953477041340797434	ÁreaÁrea PIResposta85382760,103069164890960,1811795587107190,521224889387041,02171418993105631,7980694290784675,0675566953477049,025701134079743418,03592



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	727	8288	0,087717	-2,15785
200	1673	9085	0,18415	-1,01532
500	5704	10943	0,521246	9,596314
1000	8861	8375	1,05803	10,53312
2000	18625	10352	1,799169	-6,25668
5000	44489	8790	5,06132	5,240043
10000	69955	7652	9,142054	-5,00915
20000	135242	7888	17.14528	-10.9553



1,144659

-3,7304

12,69798

-5,23835

-9,36507

1,817026

5,320655

8,948732

17,11943

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	761	8519	0,08933	-2,7873
200	1724	8881	0,194122	4,122638
500	5548	11271	0,492237	4,822276
1000	8180	8672	0,943266	0,199755
2000	18510	10742	1,723143	-8,58432
5000	43203	8249	5,237362	11,03585
10000	68913	7469	9,226536	-2,21492
20000	139182	7897	17,62467	-6,61641

AMK



	◆ y = -0,0009266	152+ 0,0003968 x ;	1/x^2 weighted; R-	^2 = 0,9892987	
0,3					•
0,2 -					
0,2 -					
0,1 -					
0.1 -					
0,0	100	200	300	400	500
0,1 []]					

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	3869	1209296	0,003199	3,981787
20	9688	1514381	0,006397	-7,71234
50	27804	1413411	0,019672	3,82145
100	40891	1184346	0,034526	-10,6531
200	99815	1296563	0,076984	-1,82596
500	259490	1169281	0,221923	12,32325

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	3979	1494314	0,002663	0,861167
20	9472	1472996	0,00643	0,86795
50	23874	1383209	0,01726	-1,66389
100	41464	1312195	0,031599	-12,4408
200	98143	1326379	0,073993	0,532241
500	223429	1076008	0,207646	11,78079



-1.81748

10,28809



-0,93822

11,27546

200

500

104162

264043

1314645 0.079232

1178036 0,224138

200

500

102994

261216

1310721 0.078578

1174821 0.222345





0,3 -					•
0,2 -					
0,2 -					
),1 -		/			
),1 -	/				
0,0	100	200	300	400	
Ť	.00	200	000		00

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	3741	1216591	0,003075	3,619008
20	9611	1516584	0,006337	-7,13484
50	27377	1400090	0,019554	3,677525
100	41854	1189383	0,03519	-8,80576
200	99676	1303544	0,076465	-2,4576
500	258745	1177718	0,2197	11,12112

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
10	3913	1223417	0,003198	4,561034
20	9479	1502613	0,006308	-8,59108
50	27557	1412075	0,019515	3,030141
100	40525	1176574	0,034443	-10,9208
200	102054	1304364	0,07824	-0,35573
500	261037	1174861	0,222185	12,30109

AFMK



5199

11133

19378

48487

1504968 0,003455

1457454 0,007639

1393732 0,013904

1402744 0,034566

-5,15138

7,111964

-1,75775

-1,75262

5

10

20



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	1211	1511621	0,000801	-2,2741
2	2513	1561425	0,001609	5,721462
5	5240	1504518	0,003483	-4,99854
10	11206	1469258	0,007627	5,803153
20	19282	1380921	0,013963	-2,52776
50	49040	1399485	0,035041	-1,70239





Concentração (nmol.L)	Area	Area PI	Resposta	Desvio(%)
1	1181	1510077	0,000782	-2,42251
2	2530	1588512	0,001593	5,466564
5	5317	1522766	0,003492	-4,70229
10	11607	1482547	0,007829	8,303613
20	18641	1324645	0,014072	-2,19447
50	48295	1410063	0,03425	-4,4443

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
1	1229	1497819	0,000821	-1,62559
2	2540	1583500	0,001604	4,488961
5	5280	1525516	0,003461	-5,77409
10	11291	1477003	0,007645	6,167308
20	18897	1327509	0,014235	-0,40027
50	48755	1411700	0,034536	-2,84378









Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	4925	2832758	0,001739	1,340209
200	9783	3022575	0,003237	-3,37726
500	26236	2960108	0,008863	7,686469
1000	41722	2814424	0,014824	-9,58525
2000	97453	3052432	0,031926	-2,33251
5000	248384	2928878	0,084805	3,948992
10000	487841	3002421	0,162483	-0,37067
20000	916878	2714923	0,337718	3,567829



Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	4727	2815430	0,001679	-1,7821
200	10524	3056386	0,003443	4,243963
500	25672	2965621	0,008657	6,863234
1000	40278	2818817	0,014289	-11,3656
2000	92168	3058488	0,030135	-6,16351
5000	246727	2936411	0,084023	4,894805
10000	490262	3012988	0,162716	1,630461
20000	901110	2723240	0,330896	3,371503



•	y = 0,0001765039+ 0	,0000165 x ; 1/x^2 weig	hted; R^2 = 0,9920631	
0,4				
0,4 -				>
0,3 -				
0,3 -				
0,2 -				
0,2 -		·		
0,1 -				
0,1 -				
0,0				
-0,1 ⁰	5000	10000	15000	20000

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)	
100	4726	2823481	0,001674	-1,31146	
200	10474	3080661	0,0034	2,618938	
500	25559	2989110	0,008551	4,637526	
1000	42004	2803891	0,014981	-7,99046	
2000	97927	3058483	0,032018	-1,4102	
5000	246364	2925115	0,084224	3,887199	
10000	489982	3046022	0,16086	-0,75026	
20000	894733	2736998	0,326903	0,872835	

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	5166	2861058	0,001806	-1,26534
200	10861	3042298	0,00357	2,833176
500	28864	3143649	0,009182	9,15373
1000	42708	2913458	0,014659	-12,2281
2000	95317	3107086	0,030677	-7,57335
5000	257211	3104827	0,082842	0,200961
10000	503374	3059542	0,164526	-0,39429
20000	829834	2261822	0,366887	11,12451



•)	y = 0,0002146961+ 0	,0000163 x ; 1/x^2 weig	hted; R^2 = 0,9913433	
0,4				•
0,4 -				/
0,3 -				
0,3 -				
0,2 -				
0,2 -				
0,1 -				
0,1 -				
0,0				
0	5000	10000	15000	2000

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
100	5094	2831333	0,001799	-1,20262
200	10945	3029924	0,003612	4,677631
500	26709	3114787	0,008575	2,390594
1000	42609	2990316	0,014249	-14,2066
2000	98270	3085125	0,031853	-3,43303
5000	256547	3100339	0,082748	0,694113
10000	499553	3074669	0,162474	-1,03971
20000	840643	2277205	0,369156	12,49291

Concentração (nmol.L)	Area	Area PI	Resposta	Desvio(%)
100	5109	2830816	0,001805	-2,44884
200	11245	3054305	0,003682	6,349463
500	26822	3092413	0,008673	3,788829
1000	40915	2861265	0,0143	-13,5894
2000	95977	3090856	0,031052	-5,4073
5000	253443	3086702	0,082108	0,48261
10000	483634	3051269	0,158503	-2,89087
20000	835931	2261928	0,369566	13,29785

MEL







	Alea	Alea FI	Respusia			Alea	Alea FI	respusia	
1	22987	1495957	0,015366	-0,8659	1	22843	1503365	0,015195	-1,07618
2	50252	1551104	0,032398	3,226425	2	50893	1574156	0,03233	3,165898
5	110582	1509802	0,073243	-7,23476	5	113156	1518337	0,074526	-5,83631
10	249821	1461563	0,170927	7,935593	10	252060	1473264	0,171089	7,60825
20	435977	1390263	0,313593	-1,08391	20	420139	1329293	0,316062	-0,76106
50	1084992	1395583	0,777447	-1,97686	50	1081093	1399688	0,772381	-3,09968

0,9

0.8

0,7

0,6

0,5

0,4

0,3

0,2

0,1

0,0




D,1]
D,1 -				/
0,0 -				-
0,0 -				
),0 -		•		
0,0 -				
0,0	500	1000	1500	
Ψ	500	1000	1000	200

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
50	1387	1402744	0,000989	6,554079
100	2499	1312258	0,001904	-10,5342
200	5341	1273681	0,004193	-10,0298
500	15539	1157985	0,013419	8,918041
1000	24371	1011129	0,024103	-3,31268
2000	41500	768412	0,054007	7,44391

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
50	1352	1399485	0,000966	6,485852
100	2487	1297757	0,001916	-9,77989
200	5581	1282835	0,004351	-7,53319
500	15325	1177553	0,013014	4,408947
1000	24515	1013199	0,024196	-4,28827
2000	43726	769010	0,05686	11,40543





,1				
,1 -				•
,1 -				
,0 -				
,0 -				
,0 -		· ·		
,0 -				
,0	500	1000	1500	
Ϋ́	500	1000	1300	200

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
50	1260	1410063	0,000894	5,362047
100	2456	1284270	0,001912	-7,83086
200	5383	1274256	0,004224	-9,10816
500	15583	1168922	0,013331	6,951004
1000	23859	1012037	0,023575	-6,81853
2000	43885	773875	0,056708	10,80178

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
50	1347	1411700	0,000954	7,201475
100	2469	1301366	0,001897	-10,5411
200	5324	1282071	0,004153	-12,3919
500	15963	1155922	0,01381	8,481262
1000	24798	1012974	0,02448	-5,18661
2000	45018	773360	0,058211	11,53318



Concentração (nmol.L)	Area	Área Pl	Resposta	Desvio(%)
50	1381	1399688	0,000987	6,415609
100	2506	1291748	0,00194	-9,55163
200	5419	1278926	0,004237	-9,90976
500	15044	1170614	0,012851	3,33474
1000	24789	1010400	0,024534	-2,69797
2000	43523	768838	0,056609	11,29741

0,1

0,1

0,0

0,0

0,0

0,0

0,0

0,0

Concentração (nmol.L)	Área	Área PI	Resposta	Desvio(%)
50	1394	1395583	0,000999	6,785844
100	2534	1299734	0,00195	-9,46786
200	5278	1274906	0,00414	-11,955
500	15984	1164600	0,013725	10,1006
1000	23827	1012513	0,023533	-6,63855
2000	43393	766805	0,056589	11,24482

7.3. Gráficos com valores de p para A172 e T98G (IFN-γ, 1-*DL*-MT e 680C91)

	TRP	QUIN	AA	KA	XA	QA	NA	QUIM
Basal	33870 ± 1286	2793 ± 139.6	-	143.6 ± 36.51	480.5 ± 107.6	251.3 ± 11.46	50.49 ± 0.7220	2.939 ± 0.2408
IFN-γ	3497 ± 578.5	8148 ± 89.93	-	140.5 ± 22.51	64.16 ± 7.839	237.8 ± 6.449	50.44 ± 4.531	2.053 ± 0.2179
p value	<0.0001	<0.0001	-	0.9469	0.0181	0.3626	0.9920	0.0525
1-MT	2471 ± 38.27	3073 ± 12.24	-	6.523 ± 0.4808	17.76 ± 0.7013	241.7 ± 7.017	77.58 ± 6.218	2.228 ± 0.01440
p value	<0.0001	0.1169	-	0.0199	0.0126	0.5153	0.0124	0.0420
680C91	44550 ± 2625	494.1 ± 6.497	-	126.0 ± 11.95	556.5 ± 51.88	226.4 ± 0.9829	47.79 ± 0.9860	1.645 ± 0.1715
p value	0.0218	<0.0001	-	0.6704	0.5589	0.0966	0.0420	0.0119

	SER	MEL	AFMK	AMK	HIAA	TRY	IAA	DMT
Deed	128.3 ±	10.47 ±	10.32 ±	146.2 ±	28.04 ±	34.86 ±	90.99 ±	6.685 ±
Basal	9.568	0.5824	0.2968	13.40	3.871	4.834	6.784	0.4433
	134.0 ±	5.419 ±	6.540 ±	100.8 ±	20.45	$_{1,1}^{24.05 \pm}$	63.39 ±	5.270 ±
ιγ	2.832	0.6363	0.8764	11.57	50.45 ±	1.341	1.328	0.2358
p value	0.5981	0.0042	0.0150	0.0620	0.6936	0.0975	0.0162	0.0480
1 MT	157.0 ±	4.345 ±	7.122 ±	61.19 ±		0.9135 ±	79.62 ±	5.287 ±
1-1/11	8.486	0.3389	0.7327	6.461	-	0.04652	5.800	1.175
p value	0.0885	0.0008	0.0155	0.0046	-	0.0022	0.2716	0.0205
680C9	137.3 ±	3.205 ±	4.741 ±	32.23 ±	32.99 ±	20.45 ±	71.40 ±	3.914 ±
1	5.788	0.4594	0.2585	5.023	4.095	1.476	2.778	0.6404
p value	0.4698	0.0006	0.0001	0.0013	0.4297	0.0464	0.0556	0.0095

A172

	TRP	QUIN	AA	KA	XA	QA	NA	QUIM
Basa	28110 + 3811	347.0 ± 21.99	-	58.33 ± 10.50	280.0 ± 43.95	217.1 ± 28.92	83.75 ± 5.775	2.917 ± 1.331
IFN-γ	2138 ± 144.2	4130 ± 89.51	237.1 ± 14.61	121.0 ± 8.954	21.18 ± 2.254	259.9 ± 3.300	91.56 ± 8.612	1.250 ± 0.1084
p valu	e 0.0024	<0.0001	-	0.0105	0.0042	0.2152	0.4935	0.2802
1-MT	25600 ± 34.79	368.8 ± 24.36	-	5.435 ± 0.7245	19.35 ± 0.3162	259.7 ± 3.083	107.4 ± 7.660	1.139 ± 0.01938
p valu	e 0.0626	0.5427	-	0.0074	0.0040	0.2165	0.0527	0.2528
680C9	01 37830 ± 2598	361.4 ± 5.358	-	88.25 ± 12.15	407.8 ± 35.92	234.9 ± 3.896	72.96 ± 1.103	1.419 ± 0.1905
p valu	e 0.1026	0.5580	-	0.1360	0.0876	0.5755	0.0404	0.3281
	0ED						/ 1^^	
	SER	IVIEL		∧ AlV	IN HIA	VA IR1		DIVIT

	SER	MEL	AFMK	AMK	HIAA	TRY	IAA	DMT
Rocal	142.1 ±	3.889 ±	37.21 ±	14.30 ±	18.63 ±	20.99 ±	66.69 ±	5.802 ±
Dasai	2.299	1.962	13.61	5.654	17.51	6.719	2.643	0.1962
	160.0 ±	2.086 ±		6.722 ±	46.96 ±	11.17 ±	60.38 ±	4.204 ±
ις ιν-γ	7.669	0.2753	-	0.6713	2.113	1.577	4.836	0.7665
p value	0.1742	0.4143	-	0.2538	0.1236	0.2277	0.4059	0.1135
	184.8 ±	1.816 ±	6.866 ±	19.67 ±		0.6233 ±	71.04 ±	3.003 ±
1-M I	6.475	0.1227	0.5795	3.118	-	0.03116	5.345	0.1143
p value	0.0154	0.3510	0.0899	0.4525	-	0.0387	0.5871	0.0002
	167.2 ±	5.302 ±	17.11 ±	26.13 ±	50.58 ±	17.07 ±	69.57 ±	6.429 ±
680C91	13.88	2.378	6.916	7.898	5.113	2.996	5.741	2.351
p value	0.2576	0.6705	0.2584	0.2902	0.1168	0.6222	0.7326	0.8035

_

8. ADENDO

DRAFT

Simultaneous analysis of tryptophan metabolites in glioma cell culture supernatant by LC-ESI-MS/MS

Ariane Rivellis Julio^a*, Renan Orsati Clara, a* Janine Baptista Coimbra^a, Felipe Augusto Dörr^a, Ana Campa^a, Ernani Pinto^a.

*Both authors contributed the same to this article.

^a Department of Clinical Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University ofaulo, São Paulo, Brazil

* Corresponding author at: Faculty of Pharmaceutical Sciences, Universidade de São Paulo, São Paulo SP - Brazil - CEP 05508-900. Tel.: +55 (11) 3091-3741; Fax: +55 (11) 3813-2197. *E-mail address: <u>ernani@usp.br</u>* (Ernani Pinto)

Artigos completos publicados em periódicos

	F	
	jica	
Irdenar por	Ordem Cronológ	

NARDINELLI, LUCIANA ; COSTA, ARIEL LAIS DE LIMA ; CHAMONE, DALTON DE ALENCAR FISHER ; BENDIT, ISRAEL . Determination of serum levels of imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia: validation and application of a new analytical method to monitor treatment compliance. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (Impresso), v. 35, p. 103-1. 🔆 💶 REZENDE, VINÍCIUS MARCONDES ; Rivellis, Ariane Julio ; GOMES, MELISSA MEDRANO ; DÖRR, FELIPE AUGUSTO ; NOVAES, MAFALDA MEGUMI YOSHINAGA ; 108, 2013.

Citações: SCOPUS 5

- 🌟 REZENDE, VINICIUS. ; RIVELLIS, ARIANE ; NOVAES, MAFALDA. ; CHAMONE, D. ; BENDIT, ISRAEL . Quantification of imatinib in human serum: validation of a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry method for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic assays.. DRUG DES DEV THER ICH, vr. 2013, p. 699-710, 2013. d.
- CAMPA, ANA . 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. The FEBS Journal dolb Moreno, ANA C. R.; CLARA, RENAN O.; COIMBRA, JANINE B.; JÚLIO, ARIANE R.; ALBUQUERQUE, RENATA C.; OLIVEIRA, EDSON M.; MARIA-ENGLER, SILVYA S.; (Print) JCR, v. n/a, p. n/a-n/a, 2013. r.

Citações: WEB OF SCIENCE * 1 | SCOPUS 1

Resumos publicados em anais de congressos

- 1. JÚLIO, A. R. ; CLARA, RENAN. O. ; COIMBRA, J. B. ; MARCHI, A. F. ; MORENO, A. C. R. ; CAMPA, A. ; Pinto, E. , IDO and TDO inhibitors induce serotonin pathway on glioma cell lines. In: Cancer and Metabolism, 2013, Amsterdam. Cancer and Metabolism 2013, v. n/a. p. n/a-n/a.
- methyl-tryptophan (1-MT): In addition to inhibiting kynurenine production, 1-MT activates the synthesis of melatonin in skin cells.. In: Cancer and Metabolism, 2013, Amsterdam. Cancer and CLARA, RENAN. O. ; COIMBRA, J. B. ; JULIO, A. R. ; ALBUQUERQUE, RENATA C. ; OLIVEIRA, E. M. ; MARIA-ENGLER, S. S. ; CAMPA, A. ; MORENO, A. C. R. . The expanding roles of 1-Metabolism 2013, 2013. 2
- 3. JÚLIO, A. R. ; Rodriguez, V. ; Pinto, E. . Avaliação do crescimento da cepa produtora de anatoxina-a(s) e determinação do grau de inibição de acetilcolinesterase. In: XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2009, Belo Horizonte. XTV Congresso Brasileiro de Toxicologia. São Paulo: Sociedade Brasileira de Toxicologia, 2009, v. 22. p. 5-327.
- 4. JÚLIO, A. R. ; Rodríguez, V. ; Pinto, E. . Obtenção de padrão de anatoxina-a(s) a partir de cepas de Anabaena spiroides.. In: XIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2008, 5ão Paulo. 110 Anos do ensino de farmácia em São Paulo XIII Semana Farmacéutica de Ciência e Tecnologia, 2008.

Currículo Lattes

	U	ŋ
	C	2
	2	
	ā	J
	>	>
L	Т	1

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

- 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Otimização de metodologia analítica para determinação cromatográfica de metabólitos do triptofano em meio de cultura DMEM. 2013. (Congresso). H
- V Simpósio da Pós-Graduação em Análises Clínicas.Desenvolvimento de um método bioanalítico para os metabólitos do triptofano. 2013. (Simpósio).
- Identificação de compostos orgânicos por espectrometria de massas. Qual é a melhor ferramenta, GCMS ou LCMS... 2012. (Seminário).
- IV Simpósio de pós-graduação em análises clínicas. 2012. (Simpósio).
- Merck Experience 2012. 2012. (Outra).
- Segurança no manuseio, descarte e transporte de resíduos químicos. 2011. (Seminário).
- XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. 2011. (Simpósio).
- ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DA ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 REQUESITOS GERAIS PARA A COMPETÊNCIA DE LABORATÓRIOS DE ENSAIO E CALIBRAÇÃO. 2010. (Outra).
- XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia. Avaliação do crescimento da cepa produtora de anatoxina-a(s) e determinação do grau de inibição de acetificolinesterase. 2009. (Congresso)
- 10. 17 Simpósio Internacional de Iniciação Científica. Obtenção de padrão de anatoxina-a(s) a partir das cepas Anabaena spiroides. 2009. (Simpósio).
- 11. 17 Semana Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Bioquímicas Oswaldo Cruz, 2008. (Outra).
- 12. XIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia.Obtenção de Padrão de anatoxina-a(s) a partir das cepas Anabaena spiroides. 2008. (Outra).



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: <u>pgfarma@usp.br</u>, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior Presidente da CPG/FCF/USP

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 7913985/1 - Ariane Rivellis Julio Email: ariane.rivellis@usp.br Data de Nascimento: 24/02/1989 Cédula de Identidade: RG - 44.866.656-X - SP Local de Nascimento: Nacionalidade: Graduação: Farmacêutico - Faculdades Oswaldo Cruz - São Paulo - Brasil - 2012 Curso: Doutorado Direto Programa: Farmácia (Análises Clínicas) Área: Análises Clínicas Data de Matrícula: 09/02/2012 Início da Contagem de Prazo: 09/02/2012 Data Limite para o Depósito: 09/02/2016 **Orientador:** Prof(a). Dr(a). Ernani Pinto Junior - 09/02/2012 até o presente. Email: ernani@usp.br Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Ana Campa - 23/05/2012 até o presente. Email: anacampa@usp.br Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 09/02/2012 Data de Aprovação no Exame de Aprovado em 21/02/2014 Qualificação: 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: Primeira Matrícula em 09/02/2012

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 20/07/2015 Impresso em: 24/11/2015 16:11:48

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



9136 - 7913985/1 - Ariane Rivellis Julio

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5813- 3/1	Aplicações de Cromatografia em Análises Toxicológicas	27/02/2012	04/04/2012	60	4	100	А	Ν	Concluída
FBC5803- 2/1	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	05/03/2012	18/03/2012	30	2	100	А	Ν	Concluída
FBC5793- 10/2	Tópicos em Análises Clínicas I	06/03/2012	26/06/2012	30	2	100	А	Ν	Concluída
FBC5748- 3/3	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	24/04/2012	05/06/2012	60	4	100	А	Ν	Concluída
FBC5734- 2/1	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	06/08/2012	12/08/2012	30	2	100	А	Ν	Concluída
FBC5757- 4/1	Tópicos em Análises Clínicas II	14/08/2012	26/11/2012	15	1	85	А	Ν	Concluída
EDM5791- 5/9	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	15/08/2012	30/11/2012	120	0	-	-	Ν	Pré- matrícula indeferida
FBC5712- 2/1	Métodos Modernos de Proteômica na Pesquisa em Análises Clínicas e Toxicólogicas	05/03/2013	15/04/2013	60	4	90	A	Ν	Concluída
EDM5791- 5/10	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação -	13/03/2013	28/06/2013	120	8	100	A	Ν	Concluída

	Créditos mínimo	Créditos mínimos exigidos	
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	25	27
Estágios:			
Total:	0	25	27

Créditos Atribuídos à Tese: 167

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 20/07/2015 Impresso em: 24/11/2015 16:11:48

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



9136 - 7913985/1 - Ariane Rivellis Julio

Comissão julgadora da tese de doutorado:				
NUSP	Nome	Vínculo	Função	
453826	Ernani Pinto Junior	FCF - USP	Presidente	

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 20/07/2015 Impresso em: 24/11/2015 16:11:48

ਵਿੱ**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. Ju´lio, 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 S˜ao Paulo, S˜ao 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, melano- cytes and melanoma cells. In addition to melatonin biosynthesis, 1-MT induced the expression of tryptophan hydroxylase, arylalkylamine-N-acetyl- transferase 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 mela- noma cell lines in response to interferon-c, a classical IDO1 inducer. In this setting, melatonin was shown to downregulate kynurenine production. Fur- thermore, in a condition of low basal activity of IDO1, it was observed that 1-MT. as well melatonin, inhibited the proliferation of human mela- noma 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-c, interferon c; 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- c (IFN-c) and/or 1-MT. IFN-c, 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-c 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-c treatment. Interestingly, among the skin cell types, fibroblasts demonstrated the greatest expression of IDO1 mRNA after IFN-c 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-c-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-c, 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-C-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-C stimulation. 1-MT treatment clearly inhibited Kyn production in all cell types, provided that they were stimulated with IFN-C (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, induction of melatonin in these cells was the



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-C/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-C-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 T 0.016 versus 0.505 T 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 T 0.36 versus 3.71 T 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 T 0.36 versus 1.25 T 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 T 0.016 versus 0.510 T 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-cellmediated 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-c. 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-c 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 Kyn, which indicates that these cells could also contribute to the process of healing via Trp metabolism. Because IFN-c 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 Oncolo' gicas 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 Universit'ario/HU-USP) and were donated by L. Maximiano (Ethics Committee 'Comit'e de E tica em Pesquisa do Hospital Universit'ario da Universidade de S ao 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. Mlt, melatonin; dotted line, inhibition; continuous line, activation.

co^{*}), respectively, supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco^{*}), penicillin (50 U·mL⁻¹) and streptomycin (50 lg·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-c (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 lg 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-c, 1-MT or melatonin treatment. The relative comparison method (2^{-DDCT}) 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 **IL** of cellular supernatant was added to 1500 **IL** 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 **IL** MilliQ water and filtered using a spin-X[®] centrifuge tube filter (Corning[®] Costar[®], Sigma). Next, 40 **IL** was injected into an HPLC Shimadzu SCL-10A vp system (Shi- madzu Corporation, Kyoto, Japan). Kynurenine was sepa- rated using a Luna C18 Phenomenex column (250 mm 9 4.6 mm inner diameter column; 5 lm) with 100% aceto- nitrile (A) and milli-Q[®] 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 \cdot 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 IL of 0.1 м NaOH and vortexed. Next, 100 IL of indole solution (100 $\lg mL^{-1}$) 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 IL of an acetonitrile-containing solution and 4 mM sodium formate (50: 50 v/v), and the tubes were vortexed for 1 min. Next, 100 IL of this solution was transferred to a Spin-X centrifuge tube with a 22 Im filter (Costar, Corning) and centrifuged for 3 min at 1 g. Subsequently, 20 IL 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, $204 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ cone gas flow, and 561 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$. 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 9 10^{-3} mbar gas cell pressure. Each of these conditions was optimized by infusing a standard melatonin solution ($1 \text{ lg} \cdot \text{mL}^{-1}$). 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 Vas the collision energy. Chromatography was performed under a gradient of 4 mM ammonium formate (pH 4, in MilliQ 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 **9** 4.6 mm, 2.6 lm; 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 **IL** 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. Trea- ted 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 \tilde{S} ao 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 smallmolecule 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.