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

Estudo da ação inibitória da enzima indolamina 2,3-dioxigenase
pelos compostos triptamina (TRY) e *N,N*-dimetiltryptamina (DMT)

Melissa Cavalheiro Tourino

Dissertação para obtenção do título de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Tit. Ana Campa

São Paulo
2012

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

T727e Tourino, Melissa Cavalheiro
Estudo da ação inibitória da enzima indolamina 2,3-dioxigenase pelos compostos triptamina (TRY) e N,N-dimetiltriptamina (DMT) / Melissa Cavalheiro Tourino. -- São Paulo, 2012.
119p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Campa, Ana

1. Bioquímica clínica : Medicina 2. Imunologia clínica : Medicina I. T. II. Campa, Ana, orientador.

616.0756 CDD

Melissa Cavalheiro Tourino

Estudo da ação inibitória da enzima indolamina 2,3-dioxigenase pelos
compostos triptamina (TRY) e *N,N*-dimetiltryptamina (DMT)

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Tit. Ana Campa
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Sabemos como é a vida: num dia dá tudo certo e no outro as coisas já não são tão perfeitas assim. Altos e baixos fazem parte da construção do nosso caráter. Afinal, cada momento, cada situação, que enfrentamos em nossas trajetórias é um desafio, uma oportunidade única de aprender, de se tornar uma pessoa melhor. Só depende de nós, das nossas escolhas...

Não sei se estou perto ou longe demais, se peguei o rumo certo ou errado. Sei apenas que sigo em frente, vivendo dias iguais de forma diferente. Já não caminho mais sozinho, levo comigo cada recordação, cada vivência, cada lição. E, mesmo que tudo não ande da forma que eu gostaria, saber que já não sou a mesma de ontem me faz perceber que valeu a pena.

Procure ser uma pessoa de valor, em vez de procurar ser uma pessoa de sucesso. O sucesso é só consequência.

(Albert Einstein)

Agradeço a DEUS em primeiríssimo lugar,
Pelo incentivo silencioso que me trouxe a essa jornada,
Pela tranquilidade e clareza que trouxe à minha vida nos momentos desespero,
Pelas experiências de vida que me propiciou,
Por estar sempre ao meu lado, iluminando meu caminho e minhas escolhas,
Por estar dentro de mim, me estimulando a ser uma pessoa melhor a cada dia.

OBRIGADA!!!

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível. (Charles Chaplin)

Eu aprendi que para se crescer como pessoa é preciso me cercar de gente mais inteligente do que eu. (William Shakespeare)

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original. (Albert Einstein)

À minha orientadora Ana Campa,
Pelo incentivo e confiança que sempre depositou em mim,
Pela amizade, força e cuidado sempre presentes,
Pelos sorrisos e alto astral característico,
Por ser essa pessoa com brilho e personalidade ímpares,
Por me ensinar o que é ciência,
Por me ensinar o que é fazer ciência,
Sempre te guardarei com muito carinho!

MUITO OBRIGADA!!!

Transportai um punhado de terra todos os dias e fareis uma montanha. (Confúcio)

Dê a quem você ama: asas para voar, raízes para voltar e motivos para ficar. (Dalai Lama)

O homem realmente livre faz tudo que lhe agrada e convém, basta apenas deter os meios e adquirir força suficiente para realizar os seus desejos. (Jean-Jaques Rosseau)

Ao meu marido, companheiro e melhor amigo Cosme,
Agradeço pelo amor e confiança,
Por ter suportado a distância,
Por ter ficado sempre ao meu lado, independente das dificuldades,
Por ter me encorajado a percorrer esse tão duro, porém recompensador caminho,
Por sonhar meus sonhos e me ajudar a torná-los realidade,
Por fazer parte dessa conquista e da minha vida!
Muito obrigada!
TE AMO!!!

Não tentes ser bem sucedido, tenta antes ser um homem de valor. (Albert Einstein)

Nós somos aquilo que fazemos repetidamente. Excelência, então, não é um modo de agir, mas um hábito. (Aristóteles)

Podemos facilmente perdoar uma criança que tem medo do escuro; a real tragédia da vida é quando os homens têm medo da luz. (Platão)

Aos meus tão amados pais, Ely e Cristina, e irmão, Eli,
Pelo amor e incentivo que sempre me dedicaram,
Pelos valores tão preciosos que me passaram,
Por me ensinarem a lutar por um ideal e nunca desanimar diante das dificuldades,
Pela presença, mesmo que distante,
Pela força e confiança,
Por me fazerem acreditar no meu potencial,
Por me ensinarem o que é ser FELIZ!
Amo muito vocês!

Agradeço às minhas especiais amigas:

Débora... pela amizade tranqüila, por me ensinar o que é ser uma profissional extremamente compenetrada e responsável, por me fazer acreditar no meu potencial. Obrigada pela torcida e carinho de sempre, e por participar de momentos tão importantes da minha vida! Adoro você!

Fran... pelo alto astral de sempre, por segurar minhas lágrimas nos momentos de tristeza e alegria, tão frequentes durante essa caminhada. Pela companhia e amizade sempre tão sinceras. Obrigada amiga pelas gargalhadas, pelas conversas sobre questões filosóficas da vida... Pela companhia nas noites de monitoria do PAE em Fisiopatologia... Muito obrigada por você ter feito parte ativamente dessa conquista! Te adoro muito!

Izaara... minha amiga, anjo da guarda, irmã! Tanto tempo de amizade e não podia estar fora dessa... obrigada pela amizade e força de sempre. Por segurar minha mão nos momentos difíceis e explodir de alegria com meus sucessos! Amiga-irmã é assim, sempre presente em qualquer situação, e assim é você! Obrigada por tudo amiga, sempre! Te adoro!

Jaciara... vulgo miguxa... sempre serei grata à sua amizade minha grande amiga! Obrigada pelos SMS diários durante toda a minha caminhada! Você prometeu que teria alguém lembrando e rezando por mim todos os dias e cumpriu... Obrigada pela força e por segurar minhas mais pesadas barras, por estar sempre do meu lado apesar da distância e por ter me ajudado a lutar contra as dificuldades! Te adoro, meu anjo da guarda!

Sabrina... ou melhor, Sá... muitíssimo obrigada por ter sido minha segunda orientadora, por ter me ensinado o que é ser uma profissional competente, pelo menos me esforcei pra aprender... E acima de tudo, obrigada pela amizade, pela conversa simples e muito sincera. E como não lembrar da viagem a São Pedro, no Free Radicals, excelente companhia de viagem! Temos que fazer isso mais vezes... adorei tudo! Te adoro na mesma proporção que te admiro!

Agradecimentos:

À USP por me receber de braços abertos e contribuir, juntamente com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, de maneira tão relevante à minha formação acadêmica.

À CNPq, CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro sem o qual minha pesquisa não poderia ter sido realizada.

Aos Professores Ernani Pinto, Irene Soares, Clélia Ferreira e Luiz Henrique Catalani pelo auxílio técnico, conhecimentos, disponibilidade e paciência.

Às Professoras Rosário Hirata, Elza Masae Mamizuka e Sayuri Myiamoto pela confiança e ensinamentos durante os estágios PAE.

À Professora Primavera e à Comissão Coordenadora do Programa (CCP) pelos auxílios financeiros que possibilitaram a visibilidade de meu trabalho em congressos de relevância para a comunidade científica.

Ao Dr. Felipe Augusto Dörr e Kátia Sanches pelo auxílio técnico-científico e pela paciência de passarem seus conhecimentos durante essa jornada.

À Claudinha pelo seu bom dia tão caloroso, me chamando de "fia" ou de "gatona", que sempre revigorava meu dia. Obrigada pelos abraços calorosos e apertados de sempre.

À Rose, sempre tão séria, mas que sempre escondeu uma pessoa doce e carinhosa. Obrigada pela presença e pelas risadas.

Às secretárias Ana, Dora, Edna e Sueli por me auxiliarem de maneira tão simpática na resolução das questões burocráticas do programa.

Aos demais professores, funcionários e colegas do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas por todos os demais tipos de auxílios concedidos.

Aos colegas do laboratório... que sabem bem que:

"O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário. " (Albert Einstein)

À Silene, pela amizade incondicional, pelas risadas gostosas e apoio técnico. Obrigada pelo ombro amigo nos momentos difíceis que passei durante minha caminhada.

À Silvana, pela inteligência e incentivo de sempre. Pelo exemplo de pessoa dedicada e super competente. Obrigada pelos conselhos tanto profissionais quanto pessoais. Pela pessoa forte e determinada que és.

À Ana Carolina, pelo incentivo e apoio técnico e científico, pelas reuniões do grupo W que sempre renderam muito conhecimento e... risadas!

Ao Edson, pelo sempre presente alto astral, pela inteligência ímpar e disposição a esclarecer quaisquer dúvidas sobre quaisquer assuntos.

À Fabiola, obrigada por ser meu exemplo mais puro de profissional competente e dedicada no sentido literal das palavras.

À Janine, por sua presença quase imperceptível, mas que revela uma pessoa inteligente e disposta.

À Luziane, pela inteligência e disponibilidade sempre demonstradas, e, como não dizer das ajudas nos finais de semana...

Ao Renan, pela inteligência excêntrica, pelos surtos matinais engraçadíssimos, pelas altas discussões, científicas e filosóficas, a respeito das tão amadas rotas do metabolismo do triptofano.

À Carolzinha, pela dedicação e inteligência que sempre demonstrou enquanto estagiária do lab.

À New Fabi, pela disponibilidade e animação de sempre, pela inteligência e disposição em aprender.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	14
RESUMO.....	15
ABSTRACT	19
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Triptamina (TRY) e <i>N,N</i> -dimetiltryptamina (DMT)	21
1.2. Indolamina 2,3-dioxigenase (IDO).....	25
1.3. Mecanismo de Imuno Escape.....	31
1.4. Uso de inibidores de IDO na terapêutica.....	37
2. OBJETIVO.....	42
2.1 Objetivos específicos.....	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Reagentes e Dispositivos	46
3.2 Equipamentos.....	47
3.3 Preparo de Soluções	48
3.4 Síntese de DMT	54
3.5 Purificação e identificação do DMT	55
3.6 Quantificação de DMT	56
3.7 Obtenção de bactérias (BL21 e DH5- α) competentes por ação de CaCl_2	56
3.8 Digestão do plasmídeo pRSET B.....	57
3.9 Transformação de cepas DH5- α competentes para clonagem de DNA	57
3.10 Extração de DNA plasmidial por lise alcalina ("medium prep").....	57
3.11 Transformação de cepas BL21 competentes para a expressão da proteína.....	58
3.12 Expressão de proteína recombinante em pequena escala.....	59
3.13 Expressão de proteína recombinante em média escala.....	60
3.14 Expressão de proteína recombinante em grande escala	60
3.15 Purificação da proteína recombinante em grande escala.....	61
3.16 Quantificação de proteína expressa.....	62
3.17 Western blotting da IDO expressa	63
3.18 Atividade de IDO.....	64
3.19 Influência dos solventes MeOH e DMSO na atividade de IDO	65
3.20 Ensaio de inibição da atividade de IDO.....	65
3.21 Ensaio de DMT e TRY como substratos de IDO	65
3.22 Ensaio cinéticos da enzima IDO.....	66
3.23 Identificação e quantificação de TRP, NFK e QUIN	67
3.24 Ensaio em células.....	68
3.24.1 Viabilidade celular pelo método de MTT.....	68
3.24.2 Viabilidade celular pelo método de azul de tripan.....	69

3.24.3 Inibição enzimática em sistema com células A172	69
3.25 Análise estatística dos dados.....	70
4. RESULTADOS	71
4.1 Purificação do DMT	72
4.2 Teste de atividade da enzima rIDO expressa.....	73
4.3 Validação da enzima rIDO expressa.....	75
4.4 Ensaios de inibição enzimática em sistema sem células	78
4.5 Cinéticas enzimáticas de inibição em sistemas sem células	82
4.6 Inibição enzimática em sistema com células A172	85
5. DISCUSSÃO	88
6. CONCLUSÕES FINAIS.....	96
REFERÊNCIAS.....	98
ANEXOS	111
ANEXO A - Histórico escolar da Pós-Graduação (Sistema Janus)	112
ANEXO B – Curriculum vitae (Plataforma Lattes)	114

Lista de Abreviaturas

1-MT	1-metil-triptofano
A172	linhagem celular de glioblastoma multiforme
ACN	acetonitrila
AM	azul de metileno
ANAVA	análise de variância
ASC	ascorbato
BL21	cepa de <i>Escherichia coli</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> – albumina sérica bovina
cDNA	fita complementar do ácido desoxirribonucléico
CaCl₂	cloreto de cálcio
COX – 2	enzima ciclooxigenase -2
D-1MT	isômero dextrógiro do 1-metil triptofano
D-TRP	isômero dextrógiro do triptofano
DC	células dendríticas
DH5-α	cepa de <i>Escherichia coli</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> – meio de Eagle modificado
DMSO	dimetilsulfóxido
DMT	<i>N,N</i> -dimetiltriptamina
DNA	ácido desoxirribonucléico
ERO	espécies reativas de oxigênio
FB	solução contendo CaCl ₂ , utilizada para obtenção de bactérias competentes
GFP	<i>green fluorescent protein</i> – proteína fluorescente verde
GM-CSF	<i>granulocyte/macrophage colony stimulating factor</i> – fator estimulador de colônia para granulócitos e macrófagos
GPCR	receptores acoplados à proteína G
H₂O	água
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> – cromatografia líquida de alta performance.
HRP	peroxidase
IDO	indolamine 2,3 dioxigenase
IDO-2	enzima indolamina 2,3 dioxigenase – 2
IFN-γ	interferon - γ

IPTG	isopropil β -D-1-tiogalactopiranosideo
KAc	acetato de potássio
KCl	cloreto de potássio
K_i	constante de inibição (mede a afinidade entre enzima e inibidor)
K_M	constante de Michaelis-Menten (mede afinidade entre enzima e substrato)
L-1MT	isômero levógiro do 1-metil triptofano
L-TRP	isômero levógiro do triptofano
LB	meio Luria Bertani
LC-MS	cromatografia líquida de alta performance acoplada a um espectrômetro de massas
LPS	lipopolissacarídeo
M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i> – fator estimulador de colônia para macrófagos
MAO	enzima monoamino oxidase
MeOH	metanol
MPO	mieloperoxidase
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo
NFK	<i>N</i> -formil-quinurenina
NK	células <i>natural killer</i>
NO	óxido nítrico
O₂	oxigênio molecular
O₂⁻	ânion superóxido
OD₆₀₀	densidade óptica a 600nm
O.N.	<i>overnight</i> (incubação por 18 horas)
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> – células mononucleares do sangue periférico (linfócitos e monócitos)
PBS	<i>phosphate buffer saline</i> - tampão fosfato salina
PCR	<i>polimerase chain reaction</i> - reação em cadeia com polimerase
PI	iodeto de propídeo
PMSF	<i>phenylmethylsulphonyl fluoride</i> - fluoreto de fenilmetilsulfonil
QUIN	quinurenina (<i>KYN</i> – <i>kynurenine</i>)
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto

RT-PCR	<i>real time polimerase chain reaction</i> - reação em cadeia da polimerase em tempo real
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> - eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SER/ 5-HT	serotonina
SFB	soro fetal bovino
SNC	sistema nervoso central
SOB	meio nutricional utilizado para o crescimento de bactérias transformadas
SOC	meio utilizado para aumentar a permeabilidade celular de bactérias durante a transformação
SOD	enzima superóxido dismutase
TAARs	receptores associados a aminas traço
TARs	receptor de aminas traço
TBS	tampão tris salina
TBS-T	tampão tris salina acrescido de 0,1% de tween 20
TDO	enzima triptofano 2,3 dioxigenase
TE	tampão tris-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilenodiamina
TFA	ácido trifluoracético
Treg	linfócitos T reguladores
TRP	triptofano
TRY	triptamina
UV	ultra violeta
VC	volume de coluna
Vis	visível

Resumo

A enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) é responsável pela degradação de triptofano (TRP) pela via das quinureninas. O aumento da expressão de IDO é a grande responsável pela resposta de tolerância imunológica e pode ser induzida por IFN- γ e lipopolissacarídeos (LPS). É conhecido que a IDO participa do mecanismo de imuno escape de células tumorais, sendo relatada como marcadora de progressão tumoral. Desta forma, a inibição da atividade da IDO para a restauração da imunidade anti-tumoral do hospedeiro tem sido considerada uma estratégia para a terapêutica antineoplásica. *N,N*-dimetiltryptamina (DMT) e triptamina (TRY) são compostos indólicos de origem endógena, provenientes de uma rota paralela de metabolismo do triptofano – a rota das triptaminas, que ocorre principalmente no sistema nervoso central. O presente estudo teve como objetivo avaliar se DMT e TRY modulariam a atividade de IDO. Os resultados obtidos demonstraram ações inibitórias para ambos os compostos e as cinéticas enzimáticas revelaram K_i de 506 μ M para o DMT e de 156 μ M para a TRY, com perfis inibitórios característicos de inibidores não-competitivos clássicos. A atividade inibitória foi também observada sobre a enzima IDO expressa constitutivamente, ou induzida por IFN- γ , em células da linhagem de glioblastoma humano A172. Nesta mesma linhagem, em estudo paralelo do grupo, foi avaliada a influência de DMT e TRY sobre a expressão gênica da enzima IDO. Concluímos que nas células a ação inibitória dos compostos avaliados é exercida diretamente sobre sua atividade enzimática, sem redução de sua transcrição. Os resultados deste estudo também serviram como base para estudos da atividade inibitória da DMT e TRY em sistema de co-cultura das células A172 com células mononucleares humanas, onde foi observada redução significativa da atividade enzimática e da proliferação das células tumorais. Em conclusão mostramos a possibilidade de que a via das triptaminas, através de seus metabólitos, possa contribuir com a regulação endógena da via das quinureninas e que o DMT e a TRY deveriam ser avaliados como candidatos a inibidores farmacológicos da enzima IDO e/ou como protótipos para a síntese de novos inibidores.

Palavras-chaves: indolamina 2,3-dioxigenase; *N,N*-dimetiltryptamina; triptamina; quinurenina, inibidores, imuno escape tumoral, via das quinureninas, via das triptaminas, regulação endógena.

Abstract

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is a tryptophan-degrading enzyme via the kynurenine pathway. Increased IDO expression is largely responsible for the immune tolerance response and can be induced by IFN- γ and lipopolysaccharide (LPS). It is known that IDO participates in the mechanism of tumor immune tolerance and have been reported as a tumor progression marker. Thus, to restore the anti-tumor immunity of the host, IDO inhibition has been considered as a strategy for anticancer therapy. *N,N*-dimethyltryptamine (DMT) and tryptamine (TRY) are endogenous indolic compounds originated from a parallel route of tryptophan metabolism - the tryptamines route, which occurs mainly in the central nervous system. This study aimed to assess whether DMT and TRY modulate the IDO activity. The results showed inhibitory actions for both compounds and enzyme kinetics revealed $K_i = 506\mu\text{M}$ to DMT and $K_i = 156\mu\text{M}$ to TRY, with inhibitory profiles characteristic of classical non-competitive inhibitors. The inhibitory activity was also observed on the IDO constitutively expressed or induced by IFN- γ in A172 human glioblastom cell line. Using the same line, in parallel group study, we evaluated the influence of DMT and TRY on the IDO gene expression. We conclude that in cells the evaluated compounds inhibitory action is exerted directly on its enzymatic activity without reduction of its transcription. The results of this study also served as the basis for studies of DMT and TRY inhibitory activity in A172 cells with human mononuclear cells co-culture system, in which was observed significant reduction in enzyme activity and tumor cells proliferation. In conclusion we show the possibility that the tryptamines route, through its metabolites, may contribute to quinurenines pathway endogenous regulation and that DMT and TRY should be evaluated as IDO pharmacological inhibitors candidates and / or as prototypes to new inhibitors synthesis.

Keywords: indoleamine 2,3-dioxygenase, *N,N*-dimethyltryptamine, tryptamine, kynurenine, inhibitors, tumor immune escape, kynurenine pathway, tryptamines pathway, endogenous regulation.

1. Introdução

A enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) é amplamente expressa em diversos tecidos do organismo e é responsável pelo metabolismo do aminoácido essencial triptofano (TRP), pela via das quinureninas. No decorrer da via são formados diversos produtos resultantes da abertura do anel indólico, que possuem juntamente com a quinurenina (QUIN), ações tolerogênicas sobre células dendríticas e de tumores [1,2], bem como ações neurodegenerativas [3,4]. Tem sido amplamente descrito o papel dos derivados da via das quinureninas no processo de imuno escape, fortemente relacionado com a progressão tumoral [5,6]. Assim, a regulação da atividade da enzima IDO vem sendo considerada um dos principais alvos na intervenção farmacológica baseada no bloqueio do imuno escape. Iniciativas deste tipo são extremamente necessárias considerando que são diagnosticados cerca de dez milhões de novos casos de câncer a cada ano no mundo e que, de acordo com estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), até 2020 é esperado um aumento de 104% nesse número [7].

N,N-dimetiltriptamina (DMT) e triptamina (TRY) são compostos sintetizados endogenamente, a partir de uma rota paralela de metabolismo do triptofano – a rota das triptaminas [8]. Este estudo pautou-se na avaliação dos efeitos inibitórios do DMT e TRY sobre a enzima IDO. A semelhança estrutural entre DMT, TRY e TRP, substrato de IDO, serviu como amparo para a avaliação da possibilidade destes compostos atuarem como inibidores endógenos da enzima e para a existência de uma regulação entre as rotas de metabolismo do triptofano.

1.1 Triptamina (TRY) e *N,N*-dimetiltriptamina (DMT)

A triptamina (TRY) e a *N,N*-dimetiltriptamina (DMT) são compostos indólicos de origem endógena, sintetizados a partir do aminoácido essencial triptofano (TRP), ao longo da via das triptaminas [8]. Essa via ocorre paralelamente a outras duas vias de metabolização do TRP, a via serotoninérgica e a via das quinureninas (Figura 1).

Figura 1: Esquema simplificado das rotas endógenas de metabolismo do aminoácido essencial triptofano *in vivo*. À esquerda observa-se a via das triptaminas, ao centro a via das quinureninas e à direita a via serotoninérgica.

De acordo com a literatura, cerca de 95% do TRP não utilizado para a síntese protéica, é metabolizado pela via das quinureninas, 3 a 4% segue a via serotoninérgica e apenas 1 a 2% é metabolizado pela via das triptaminas. [9-11]. Esta é composta por três reações subseqüentes, sendo a primeira delas a descarboxilação do TRP, catalisada pela enzima aminoácido aromático descarboxilase (AADC), que culmina na formação da triptamina (TRY). Em seguida ocorrem duas reações de metilação, por ação da indoletilamina-*N*-metiltransferase (INMT), dando origem à metiltriptamina e à *N,N*-dimetiltriptamina (DMT), respectivamente (Figura 2) [8,12]. As duas últimas etapas utilizam a S-adenosil metionina como doadora de grupamentos metila.

Figura 2: Biossíntese de DMT a partir de triptofano. (AADC) aminoácido aromático descarboxilase; (INMT) indoletilamina-*N*-metiltransferase; (SAM) S-adenosil-metionina; (SAH) S-adenosil-homocisteína. (Modificado de Jacob, M. S., 2005 [8]).

A reação de síntese endógena da TRY ocorre principalmente no sistema nervoso central. Segundo estudos imunohistoquímicos feitos por Brusco, A. e colaboradores [13] utilizando cérebro de ratos, a TRY é encontrada no mesencéfalo, medula, substância nigra, hipocampo, entre outros. Já o DMT também é encontrado no sistema nervoso central, porém, em humanos foi detectada a expressão de transcritos da enzima INMT apenas nos pulmões, tireóide, glândula adrenal,

coração, músculos e medula espinhal [14]. Segundo a literatura, o fato de serem encontrados transcritos dessa enzima apenas nesses locais, não impede que o DMT seja produzido no cérebro [8], uma vez que já foi demonstrado aumento da atividade da INMT no cérebro de roedores expostos a situações de estresse [15]. Sendo assim, situações de estresse que aumentem a produção de TRY, podem consequentemente levar a um aumento significativo de DMT. Adicionalmente, o fato de serem encontrados transcritos de INMT em tecidos periféricos, sugere-se que o DMT possa ser sintetizado fora do cérebro, mas mesmo assim exercer ações sobre ele, devido à sua capacidade de atravessar prontamente a barreira hematoencefálica [8].

DMT e TRY, ao lado de outros compostos, fazem parte de um grupo de aminas vaso ativas chamadas "aminas traço" que, conforme a própria nomenclatura diz, são encontradas em baixíssimas concentrações (0,1 – 100 ng/g de tecido) e estão envolvidas na etiologia de diversos distúrbios neurológicos como depressão e esquizofrenia [16-20]. A quantificação de DMT e TRY foi feita inicialmente por Franzen, F. R. [21] em indivíduos saudáveis e revelou concentrações de DMT variando de 0,008-0,055 µg/mL no sangue e $42,98 \pm 8,6$ µg/24 horas na urina e de TRY entre 0,005 – 0,02 µg/mL no sangue e 30 – 120 µg/24 horas na urina, sendo detectados também em fluido cérebro espinhal [22]. Porém, estudos subseqüentes encontraram concentrações menos elevadas, cerca de 0,0005 µg/mL de DMT no sangue [23] e de 0,4 µg/24 horas de DMT na urina [24]. Ainda hoje não há estudos quantitativos conclusivos a respeito da concentração exata de DMT e TRY devido à rápida degradação que sofrem pela enzima monoamino oxidase (MAO) [25].

Atualmente há poucos estudos sobre o metabolismo endógeno do DMT. Sabe-se que de uma dose administrada por via intramuscular, apenas 0,07% é

eliminada pela via urinária sob forma inalterada [26] e que 25% são resultantes da conversão a ácido-3-indoloacético (AIA) [27], sugerindo que possam existir metabólitos ainda desconhecidos. Um estudo realizado em 1986 com eritrócitos, evidenciou a formação de um composto deformilado, decorrente da abertura do anel indólico da estrutura do DMT, denominado *N,N*-dimetilquinuramina (DMK) [28]. Em 2008, Gomes, M. M. [29] confirmou a existência desse composto em decorrência do metabolismo endógeno do DMT pela enzima mieloperoxidase (MPO) expressa por neutrófilos ativados. O mesmo trabalho identificou também o composto formilado *N,N*-dimetil-*N*-formilquinuramina (DMFK) e o hidroxilado, hidróxi-*N,N*-dimetiltriptamina (OH-DMT), nas mesmas condições. Esse composto foi também identificado por McIlhenny, E. H. e colaboradores [30] como sendo 5-OH-DMT, porém sua origem metabólica não foi totalmente elucidada. A figura 3 mostra as estruturas químicas do DMT e seus metabólitos endógenos já descritos.

Figura 3: Estruturas químicas do DMT e seus metabólitos endógenos, resultantes de reações de hidroxilação e abertura do anel indólico (Modificado de McIlhenny, E. H., 2010 [30]).

O DMT apresenta marcante atividade alucinógena, sendo seu mecanismo de ação motivo de estudos durante anos. No ano de 2001 foi identificada uma família de receptores associados às aminas traço (TAARs), acoplados à proteína G (GPCRs) [31], presentes no estômago, rins, pulmões e principalmente no cérebro,

com afinidade por anfetamina, 3,4-metilenodioxymetanfetamina (MDMA ou “ecstasy”) e dietilamida do ácido lisérgico (LSD), além de DMT e TRY [31-34]. Entretanto, estudos comportamentais suportam a hipótese de que os efeitos subjetivos provocados pelo DMT dependem da ligação a receptores sigma-1 (presentes no cérebro, trato gastrintestinal (TGI), fígado e coração) [35], além de atuar como agonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} [36], 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} [37], presentes no cérebro.

Além da síntese endógena, o DMT também apresenta origem vegetal e está presente como constituinte principal do chá alucinógeno conhecido por ayahuasca ou ainda Chá do Santo Daime, de origem xamânica [8,38]. De acordo com estudos, a administração de uma dose oral correspondente a 1,0mg de DMT/Kg de peso corporal leva à ativação significativa das regiões frontal e paralímbica do cérebro, comprovando a interação entre o chá e o processamento emocional [39]. Entretanto, é importante salientar que a dose limiar capaz de produzir efeitos subjetivos nos seres humanos é cerca de 50µg de DMT/Kg de peso, levando a um pico de concentração plasmática de aproximadamente 0,01µg/mL. [40,41]. O DMT não possui ação alucinógena se ingerido isoladamente, devido à rápida degradação sofrida por ação da enzima monoamino oxidase (MAO) tipo A, encontrada no trato gastrintestinal [42]. Assim, também estão presentes no chá as β-carbolinas como harmina, harmalina e tetra-hidro-harmalina que atuam como inibidores da MAO [43].

1.2. Indolamina 2,3-dioxigenase (IDO)

A enzima indolamina 2,3 dioxigenase é uma hemoproteína, monomérica, de aproximadamente 45kDa, descoberta há quase 40 anos [44], porém teve sua estrutura terciária desvendada somente em 2006 [45]. É caracterizada pela

presença de dois domínios (Figura 4), um maior e um menor, com um grupo heme entre eles, cujo grupo prostético é a protoporfirina IX. Seu estudo cristalográfico mostrou que uma condição necessária para que ocorra reação enzimática é a geometria exata entre substrato e dioxigênio (O_2), causada por estreitas relações entre o anel indólico do substrato e a porção hidrofóbica da proteína. A codificação da enzima é feita pelo gene *INDO*, presente no cromossoma humano 8 p12-p11 [5], que possui variabilidades genéticas como possíveis fontes de diferenças entre atividades de IDO de diferentes indivíduos [46].

Figura 4: Representação da estrutura terciária de IDO, composta por um domínio menor (azul escuro) e um domínio maior (verde). A cadeia de ligação pode ser vista em azul ciano, e o loop longo de conexão entre os dois domínios, em vermelho. O grupamento heme encontra-se em amarelo. (Retirado de: Sugimoto e colaboradores 2006 [45].)

A IDO é conhecida por ser o passo inicial e limitante, ao lado de enzimas como a triptofano dioxigenase (TDO) e a IDO-2 [9,47,48], da via das quinureninas, principal rota de metabolismo do TRP não utilizado para a síntese protéica e responsável pela produção de vários compostos ativos (Figura 5). A função da IDO é catalisar a oxidação do TRP a N-formilquinurenina (NFK), posteriormente deformilada a quinurenina (QUIN). A oxidação se dá através da clivagem do anel

pirrólico do TRP por inserção de dois átomos de oxigênio nas posições C2 e C3 [49], conforme esquema da figura 6.

Figura 5: Esquema do metabolismo de TRP pela via das quinureninas (Retirado de: Giani, D. A. e colaboradores, 1996 [50]).

Figura 6: Esquema mostrando a interação de IDO com TRP, levando à clivagem do anel indólico e à inserção de dois átomos de oxigênio na molécula. (Modificado de: Sugimoto, H. e colaboradores, 2006 [45])

Como substrato, a enzima demonstra maior especificidade pelo L -TRP, porém, há descrição de outros substratos como D -TRP e 5-metoxi- D - L -TRP [51]. Estudos mecanísticos da reação entre L -TRP e IDO demonstraram que a enzima encontra-se naturalmente sob a forma férrica (Fe^{+3}), não cataliticamente ativa, sendo necessária a presença de um agente redutor para reduzi-la à forma ferrosa, cataliticamente ativa [52]. O sistema ascorbato/azul de metileno (Figura 7) é bastante utilizado nas reações *in vitro* sem células [52-54] como possível gerador de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que seria o responsável por essa redução. Porém estudos subsequentes questionam essa posição e propõem um mecanismo envolvendo o sistema citocromo b5/citocromo P450 redutase na presença de sistema regenerador de NADPH (NADPH/glucose 6 fosfato/ glicose 6 fosfato desidrogenase) que poderia atuar em ambos ensaios (*in vitro* e *in vivo*) [55]. Uma vez que a IDO- Fe^{+3} é ativada a IDO- Fe^{+2} , o sistema dioxigenásico se mantém às custas de oxigênio molecular (O_2). O agente redutor necessário, *in vivo*, ainda é desconhecido.

Figura 7: Proposta do mecanismo de como o sistema ascorbato/azul de metileno, utilizado nas reações de IDO *in vitro*, promove a redução do Fe^{3+} da IDO para o Fe^{2+} levando à formação do complexo catalítico com TRP. (Esquema alterado de: Sedlmayr, P. e colaboradores, 2002 [56]).

Além de ser uma enzima dioxigenásica, a IDO apresenta uma leve atividade peroxidásica [57,58], devido ao seu grupo heme, sendo capaz de reagir com H_2O_2 [51]. Entretanto, mesmo diante disso, pode também ser inibida por H_2O_2 , ainda que em concentrações relativamente baixas ($10\mu\text{M}$) [58], uma vez que esta leva à oxidação de sua forma ferrosa à férrica, cataliticamente inativa. Devido a isso é necessária a adição de catalase, enzima responsável pela degradação de H_2O_2 , nos ensaios de atividade de IDO *in vitro* [59].

A IDO é amplamente expressa em diversos tecidos de mamíferos, como placenta [56], intestino [60], a microglia [61], órgãos reprodutores, pulmão [62], epidídimo, timo [5,63], células dendríticas [64-66] e células do sistema imune [67], inclusive durante suas funções fisiológicas. Sua expressão pode ser induzida por vírus [5], lipopolissacarídeos (LPS) [68,69] e principalmente por $\text{IFN-}\gamma$ [50,63,64,68,70]. Inicialmente, o $\text{IFN-}\gamma$ era conhecido por ter propriedades anti-

oncogênicas, uma vez que induzia a atividade da IDO, matando as células cancerígenas por provocar ausência do aminoácido triptofano, essencial para a síntese protéica [71]. Porém, subsequentemente foi descrito que o IFN- γ secretado por linfócitos T ativados regula a IDO expressa pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), sugerindo um possível feedback negativo para a regulação de células T ativadas [70, 72]. Sendo assim, a atividade elevada da IDO, por gerar danos à resposta imune das células T, contribui para a tolerância imunológica patológica, exercendo também papel pró-oncogênico [5].

A evidência inicial da relação entre câncer e elevado catabolismo de triptofano surgiu na década de 50, quando foram encontrados metabólitos do triptofano na urina de pacientes com câncer de bexiga [73], sendo posteriormente confirmada por estudos que tiveram a mesma conclusão diante de cânceres de mama, próstata, linfoma de Hodgkin e leucemia [74,75]. Já a primeira descrição da IDO como agente imunossupressor foi feita em 1998, por Munn, D.H. e colaboradores [76], após a demonstração em camundongos, de que a expressão desta enzima na placenta protege o feto semi-alógeno contra o ataque de células T maternas. Ou seja, após o implante, células do embrião passam a sintetizar IDO, que atua como uma barreira, impedindo a migração das células T maternas da circulação ao tecido fetal. Esse fato foi demonstrado experimentalmente utilizando um inibidor clássico da IDO, 1-metil-triptofano (1-MT), onde os fetos foram sistematicamente rejeitados [76,77]. Segundo a literatura, as ações imunomodulatórias da IDO são seletivas e focadas, não sendo necessárias para a tolerância a antígenos do próprio organismo [78-80]. Esse fato traduz uma vantagem no que diz respeito ao uso de inibidores de IDO na terapia do câncer, dado que não são desenvolvidas reações auto-imunes exacerbadas e espontâneas no paciente.

Em 2007, foi descoberta a expressão de uma proteína com função semelhante à IDO em humanos e camundongos, sendo denominada IDO-2 [81-84]. O gene para essa proteína está codificado no cromossoma 8 adjacente ao da IDO, o que sugere que sejam formados por duplicação de genes. Apesar das IDOs serem expressas concomitantemente em alguns tecidos, estudos imunohistoquímicos demonstraram que são produzidas em tipos celulares diferentes, sugerindo função não redundante [82]. Mesmo apresentando homologia entre si, as IDOs são induzidas por estímulos distintos [82, 85], estando a IDO-2 responsável pela produção de apenas 3-5% de QUIN, quando comparada a IDO nas condições estabelecidas para a atividade de IDO *in vitro* [86].

1.3. Mecanismo de Imuno Escape

O equilíbrio do sistema imunológico de um indivíduo é essencial para sua proteção contra a maioria das doenças, principalmente o câncer, caso em que uma desordem no sistema pode contribuir para a progressão da enfermidade. Isso pode ser evidenciado por pesquisas que revelam risco significativamente maior de pacientes imunossuprimidos desenvolverem câncer, principalmente de origem viral [87,88]. Diversos estudos mostram que tumores utilizam estratégias eficazes de invasão baseadas no mecanismo de imuno escape tumoral, gerando tolerância e contribuindo para um mau prognóstico [5,6] embora essa correlação nem sempre seja evidente [5].

Para se entender o mecanismo de imuno escape, é necessário a compreensão do chamado planejamento imune contra o câncer, que ocorre em três fases (Figura 8). A primeira etapa do planejamento imune envolve a resposta do

Figura 8: Esquema das três etapas do planejamento imune contra o câncer. Fases de eliminação, equilíbrio e imuno escape. (Retirado de: Swann, J. B. et al, 2007 [89]).

A IDO faz parte do grupo composto por várias moléculas e mecanismos celulares que estão sendo estudados como provedores da capacidade de ataque ao sistema imune do hospedeiro [4,67]. De acordo com pesquisas [72,90,91], a depleção do TRP e/ou a presença de catabólitos tóxicos resultantes da atividade da IDO, diminuem a proliferação (Figura 9A) e contagem de células T CD3+, CD8+, CD57+ e NK, porém não de linfócitos B, além de bloquear seus ciclos celulares (Figura 9B). Demonstram também influência sobre a regulação e expressão de receptores específicos de citocinas responsáveis por induzir a atividade de células NK [92].

Figura 9: Relação dose-resposta entre IDO e proliferação de células T (A) e percentagem de células presentes nos estágios S e M do ciclo celular (B). (Retirado de: Frumento, G. e colaboradores, 2002 [72]).

Mais especificamente, os principais metabólitos do triptofano responsáveis pela inibição da proliferação e bloqueio do ciclo celular das células T, são L-quinurenina e ácido picolínico (Figura 10), sendo o ácido quinolínico, pouco eficiente. Dentre os três metabólitos, a L-quinurenina demonstra a maior eficiência, podendo provocar inibição irreversível da proliferação celular dependendo da dose [72].

Figura 10: Efeito dos metabólitos do triptofano sobre a proliferação de células T (A) e sobre a percentagem de células nos estágios S e M do ciclo celular (B). (Retirado de: Frumento G. e colaboradores, 2002 [72])

De acordo com alguns estudos, as células dendríticas (DCs), também chamadas células apresentadoras de antígenos "profissionais" (APCs), também desempenham importante papel no mecanismo de tolerância imunológica devido à expressão de IDO. Esta foi considerada proteína fundamental na caracterização dessas células, quando apresentavam funções reguladoras [93] e de macrófagos com atividade supressora [94,95]. Nesse contexto, a determinação da ação a ser desempenhada pelas células dendríticas está relacionada à atividade da IDO que expressam, podendo ser excessivamente potentes, levando à autoimunidade, ou excessivamente fracas, favorecendo o processo de tolerância a tumores e patógenos [60]. Acredita-se que a influência da presença da QUIN e outros compostos intermediários promovam uma retroalimentação positiva, uma vez que ativam células T reguladoras (T_{reg}) e células dendríticas supressoras, que são capazes de suprimir a atividade de linfócitos T_{CD8}^{+} [96]. Vários estudos têm sugerido que a presença de células dendríticas IDO^{+} em linfonodos que drenam o tumor silenciam as células T tumor-específicas e convertem células T_{CD4}^{+} a T_{reg} [96-98],

fato também associado a um mau prognóstico da doença. Entretanto a correlação entre a supressão imune e o mau prognóstico não são sempre evidentes, uma vez que em linfoma de Hodgkin, um aumento de T_{regs} está associado a um bom prognóstico [99].

Um estudo publicado em 2003 [67] revelou que a grande maioria dos tumores humanos expressam IDO de maneira constitutiva. Valendo-se de ensaios de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR), comprovaram a expressão de mRNA do gene INDO, responsável pela codificação da enzima IDO, em muitas linhagens de células tumorais (Tabela 1). A presença da proteína foi detectada nos lisados dessas células na ausência de exposição ao $IFN-\gamma$, ou seja, constitutivamente, sendo as maiores proporções encontradas nos carcinomas de próstata, pâncreas e coloretal. Além disso, a IDO pode ser considerada um excelente marcador de crescimento tumoral e, portanto, com papel prognóstico [100]. Essa hipótese é amparada pelo estudo de Weinlich, G. e colaboradores [101], que demonstrou que em pacientes com melanoma as concentrações de triptofano são significativamente menores do que em pacientes saudáveis, associados à elevada razão entre quinureninas/triptofano e elevadas concentrações de neopterina (marcadora de ativação do sistema imune). A mesma relação ocorreu comparando-se pacientes que morreram pela progressão do câncer e pacientes sobreviventes portadores da doença, sugerindo que a elevada expressão da IDO pode desempenhar um importante papel na progressão tumoral. Além disso, a IDO já foi associada a resultados clínicos indesejáveis em câncer endometrial [102], de ovário [103], de pulmão [104] e coloretal [105,106].

Tabela 1- Expressão de IDO em tumores humanos

Tumor type	IDO-positive tumor samples ^a (no. positive per no. tested)	Proportion of IDO-positive tumor cells ^b		
		>50%	10–50%	<10%
Prostatic carcinomas	11/11	7	3	1
Colorectal carcinomas	10/10	5	3	2
Pancreatic carcinomas	10/10	8	2	0
Cervical carcinomas	10/10	0	4	6
Endometrial carcinomas	5/5	0	3	2
Gastric carcinomas	9/10	4	3	2
Glioblastomas	9/10	6	3	0
Non-small-cell lung carcinomas	9/11	1	1	7
Bladder carcinomas	8/10	3	1	4
Ovarian carcinomas	8/10	0	3	5
Head and neck carcinomas	7/11	0	3	4
Esophageal carcinomas	7/10	1	2	4
Mesotheliomas	6/10	2	1	3
Renal cell carcinomas	5/10	0	1	4
Melanomas	11/25	0	0	11
Breast carcinomas	3/10	2	0	1
Thyroid carcinomas	2/10	0	0	2
Lymphomas	4/18	0	0	4
Small-cell lung carcinomas	2/10	0	0	2
Sarcomas	2/10	0	1	1
Hepatocarcinomas	2/5	0	0	2
Adrenal carcinomas	2/5	1	0	1
Choriocarcinomas	1/5	0	0	1
Cutaneous basocellular carcinomas	1/5	0	0	1
Testicular seminomas	0/10	0	0	0

(Fonte: Uyttenhove, C. *et al*, 2003, *Nat. Med.* 9: 1269-1274 [67])

O entendimento da correlação entre expressão de IDO e imunoregulação é importante para que se reconheçam mais detalhadamente os mecanismos bioquímicos do câncer e para que se desenvolvam propostas terapêuticas inovadoras para o tratamento dessa doença que atinge milhões de seres humanos.

1.4. Uso de inibidores de IDO na terapêutica

O papel da quimioterapia anti-tumoral na relação tumor-hospedeiro é promover respostas imunes efetivas ao hospedeiro contra antígenos expressos pelo tumor, porém, conforme descrito na literatura, o mecanismo de imuno escape desenvolvido pelas células tumorais pode influenciar no sucesso dessa intervenção imunoterapêutica [4,60]. Tendo a IDO papel bastante relevante nesse cenário de imuno escape, pequenas moléculas capazes de inibi-la vêm oferecendo uma estratégia inovadora e promissora para a terapêutica do câncer [4,5,107]. A evidência inicial desse fato surgiu em 2002, quando na presença do inibidor de IDO 1-metiltryptofano (1-MT), houve diminuição no crescimento de células de câncer de pulmão murino [108], fato posteriormente confirmado por estudos pré-clínicos nos quais observou-se que células dendríticas IDO⁺ que drenam o tumor e são capazes de levar células T à anergia, perderam essa capacidade na presença de 1-MT [99,109]. Este é hoje considerado o inibidor clássico de IDO e encontra-se em fase de pesquisa clínica para avaliação de sua eficiência no tratamento anti-tumoral [5]. Entretanto, sabe-se que a eficácia anti-tumoral dos inibidores de IDO é limitada quando administrados isoladamente, apresentando melhores resultados como coadjuvantes na terapêutica, devendo ser administrados concomitantemente com agentes quimioterápicos citotóxicos [5,6,65,80,99,107]. Nesse sentido, diversos grupos de pesquisa trabalham pela busca de inibidores novos e mais potentes da IDO, endógenos ou sintéticos.

Estruturalmente falando, o fato da IDO apresentar diferentes sítios de ligação para cofator e substrato [110] permite o desenvolvimento de inibidores dos tipos competitivo e não competitivo, ampliando o número de possíveis moléculas

inibidoras. Os primeiros inibidores de IDO, o composto norharman e o 4-fenilimidazol (Figura 11), foram descritos em 1989 [111] como inibidores do tipo não-competitivos, porém com mecanismos de ação diferentes. Enquanto o norharman ($K_i = 176\mu\text{M}$) competia com o oxigênio molecular (O_2), necessário à atividade dioxigenásica da enzima, o 4-fenilimidazol ($K_i = 8\mu\text{M}$) se ligava à enzima na sua forma férrica, impedindo sua redução à forma ferrosa, cataliticamente ativa. Durante muito tempo, os melhores inibidores de IDO eram provenientes de alterações na molécula do TRP, entre elas a inserção de uma metila no nitrogênio do anel indólico, originando sinteticamente o 1-MT (Figura 11), com $K_i = 34\mu\text{M}$ e a substituição do nitrogênio do anel por oxigênio ou por enxofre, que impactaram significativamente sobre a atividade catalítica da enzima [112], originando inibidores que apresentavam afinidade pela enzima na ordem de nanomolar [113,114].

Figura 11: Estruturas químicas dos compostos norharman, 4-fenilimidazol e 1-MT, que exercem inibição enzimática significativa sobre a enzima IDO.

Após a elucidação da estrutura cristalina da IDO em 2006 [45] foi possível verificar que outros núcleos poderiam ser bons inibidores. Nessa época foram identificados diversos compostos extraídos de invertebrados marinhos, como a naftoquinona e adocioquinona A e B [115-117] (Figura 12). Esses compostos apresentaram valores de K_i da ordem de nanomolar, porém mostraram-se inativos

em ensaios celulares, sugerindo dificuldades em atravessar a membrana celular [118]. Ainda nessa época, foi identificada a brassinina (Figura 12) [119,120], composto natural derivado de vegetais como repolho chinês e brócolis [121,122], com K_i de 27,9 μ M. Ao lado de seu derivado sintético, 5-bromo-brassinina (5-Br-brassinina – Figura 12) com K_i de 24,5 μ M, apresentou atividade quimiopreventiva em câncer de glândulas mamárias e melanoma de modelos animais [121,122].

Figura 12: Representação das estruturas químicas da naftoquinona, adocioquinona A e B, brassinina e 5-Br-brassinina, inibidores de IDO de origem natural.

Mais recentemente, em 2010, foi feito um estudo baseado na relação estrutura atividade entre IDO e 55 possíveis inibidores sintéticos [123], analisados por *docking*, que identificou os compostos 2-mercapto-benzotiazol, 2-mercapto-feniltiazol e feniltiazol (Figura 13) como sendo os mais eficientes. Estes compostos

apresentaram K_i de 7,4 μ M, 7,4 μ M e 8,9 μ M respectivamente e mostraram-se tão seguros quanto eficientes, tanto em sistemas sem células quanto em sistemas com células. Ainda nesse estudo, Röhrig, U. F. e colaboradores demonstraram que, para uma eficiente ação inibitória, os inibidores de IDO devem conter (i) um fragmento aromático bicíclico para preencher o sítio de ligação; (ii) um átomo com pares de elétrons livres que possa coordenar com o ferro do grupo heme (como nitrogênio, oxigênio ou enxofre); (iii) um grupo capaz de estabelecer ligação de van der Waals e (iv) um grupo capaz de estabelecer pontes de hidrogênio com fragmentos de aminoácidos específicos da estrutura da IDO.

Figura 13: Representação das estruturas químicas do 2-mercapto-benzotiazol, 2-mercapto-feniltiazol e feniltiazol, inibidores de IDO sintéticos identificados por análise da relação estrutura atividade.

Adicionalmente, há outros trabalhos que demonstraram inibição indireta da atividade de IDO. Um estudo envolvendo prostaglandinas revelou que as enzimas fosfolipase A2 e COX-2, essenciais para sua síntese, desempenham importante papel na indução da IDO por IFN- γ e que seus inibidores, como salicilatos e glicorticóides, são capazes de bloquear essa indução [124]. O mesmo acontece com a produção de óxido nítrico (NO) pela enzima NO sintase induzida (iNOS) [125], interferindo diretamente na atividade enzimática [125-127] e promovendo sua degradação proteolítica [128]. Nesse sentido, acredita-se que agonistas de NO

podem reverter o estado de imunossupressão gerado pela IDO em casos de câncer, contribuindo, assim, para a terapêutica. Agentes antioxidantes, por inativarem espécies reativas de oxigênio (EROs), também desempenham um interessante papel na inibição da atividade da IDO mediada por IFN- γ em macrófagos derivados de monócitos [59].

Conforme demonstrado acima, a busca por inibidores de IDO mais eficientes e menos tóxicos tem sido alvo de diversos grupos de pesquisa, revelando-se ser uma área extensa e muito promissora no que diz respeito a inovações terapêuticas para o câncer.

2. Objetivo

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a possível ação inibitória de produtos indólicos como DMT e TRY sobre a enzima IDO, que possui importante papel no mecanismo de imuno escape tumoral. Parte dos ensaios foi desenvolvida em sistema livre de células e, para a avaliação da atividade inibitória em sistema biológico, foi utilizado como modelo experimental a linhagem celular de glioblastoma multiforme A172. De acordo com Uyttenhov, C. e colaboradores [67], nove em cada 10 casos analisados de tumor da glia expressam IDO constitutivamente. Na linhagem A172 há essa expressão constitutiva de IDO, além da possibilidade de induzi-la por IFN- γ . Ainda, segundo resultados obtidos por nosso grupo [130], foi identificado que a linhagem A172 expressa a enzima INMT (indoletilamina-N-metiltransferase) da rota das triptaminas. Desta forma a utilização da linhagem A172 pareceu atraente para o nosso estudo.

2.1 Objetivos específicos

- I. Sintetizar o DMT, uma vez que se trata de um composto não disponível comercialmente, e purificá-lo a fim de obter um produto puro e confiável para a execução dos ensaios de inibição enzimática.
- II. Expressar a enzima IDO recombinante humana.
- III. Avaliar os parâmetros cinéticos da enzima expressa.
- IV. Avaliar possíveis ações inibitórias do DMT e da TRY, sobre a reação de IDO, em sistema *in vitro*, livre de células.

- V. Analisar a possibilidade de haver interação do tipo enzima-substrato entre a enzima IDO e o DMT e/ou TRY.
- VI. Avaliar os parâmetros cinéticos do processo inibitório e determinar o tipo de inibição dos possíveis inibidores, com seus respectivos K_i .
- VII. Analisar possíveis efeitos tóxicos provocados pela presença do DMT e da TRY em sistema de cultura de células da linhagem de glioblastoma A172.
- VIII. Avaliar possíveis ações inibitórias do DMT e da TRY em sistema simples de cultura de células utilizando a linhagem de glioblastoma A172.

3. Materiais e Métodos

3.1 Reagentes e Dispositivos

Os reagentes acetonitrila (ACN) grau HPLC, ácido acético glacial, ácido clorídrico fumegante, álcool etílico P.A., agar-agar, cloreto de cálcio, cloreto de sódio, clorofórmio, diclorometano, fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio bibásico, glicerol, hidróxido de sódio, isopropanol, metanol, metanol grau HPLC, peróxido de hidrogênio 30%, sulfato de amônia e tween 20 foram adquiridos da Merck kGaA (Darmstadt, Alemanha). 1-metil-DL-triptofano, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo (MTT), β -mercaptoetanol, ácido ascórbico, ácido tricloroacético, acrilamida, albumina sérica bovina (BSA), azul de metileno, bis-acrilamida, catalase, cloreto de amônio, dimetilsulfóxido (DMSO), dodecil sulfato de sódio (lauril sulfato de sódio – SDS), glicina, imidazol, isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), lisozima, persulfato de amônio, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), ponceau S, quirunenina, soro fetal bovino (SFB), N,N,N',N'-tetrametiletileneodiamina (TEMED), triptamina, L-triptofano, trizma base, trizma hidrocloreto foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (Mo-USA)/ Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinbein, Alemanha). Azul de Coomassie G 250, azul de Coomassie R 250, reagente para quantificação de proteínas (Bradford) são provenientes da empresa Bio Rad Laboratories. Os anticorpos anti indolamina 2, 3 dioxigenase (humano) e secundário anti coelho marcado com HRP foram adquiridos da empresa Santa Cruz Biotecnologia. O extrato de levedura e a triptona foram obtidos da empresa Oxoid (Hampshire, Inglaterra). O meio de cultura celular Dulbecco-Eagle modificado (DMEM), o plasmídeo pRSET B e a tripsina foram adquiridos da Invitrogen Corporation (USA). As placas para cultura celular foram adquiridas da Corning Life Sciences (USA).

Os filmes de revelação, os padrões de peso molecular de proteínas de baixo peso (97, 66, 45, 30, 20.1 e 14.4 kDa), kit de revelação ECL, membrana de nitrocelulose para transferência de proteínas (poro de 0,45 µm) e a resina da coluna de níquel para purificação de proteínas foram obtidos da empresa GE Healthcare (USA).

A água ultra-pura é proveniente do equipamento Milli Q Synthesis, previamente purificado pelo equipamento Elix equipamentos Millipore Indústria e Comércio (USA), garantindo uma boa qualidade da água.

As cepas de *Escherichia coli* foram gentilmente cedidas pela professora Irene da Silva Soares do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

3.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste projeto foram: agitador magnético de bancada (Fisaton – 752); balança analítica (Shimatsu – BL 3200H); banho de água a 37°C (Fanem – 100); banho seco para microtubos de 1,5 mL (Eppendorf – Thermostat plus); centrífuga de bancada refrigerada (Eppendorf – 5804 R); centrífuga refrigerada (Himac CR 20B2 Hitachi, rotor RPR20-2); cuba de transferência em tanque (BIORAD modelo Mini Trans-Blot cell); cuba para eletroforese vertical (BIORAD modelo Mini Protean III); espectrofotômetros (Shimatsu – UV-1601PC e BioTek – Synergy MX); estufa bacteriana; estufa de CO₂ (Spectrum – Thermo Scientific); fluxo laminar (VECO, modelo VSLF 90); freezer –20° C e –80° C; microscópio invertido (Nikon TS100); pHmetro (Quimis – SC09); revelador para Western blot (Image Quant 400 - controlado por software de mesmo

nome); sonificador bradson ultrasonifier 450; rotaevaporador (Concentrator Plus - Eppendorff); LC-MS (HPLC Shimadzu Prominence, com duas bombas LC-20AD, autoinjetor SIL-20AC, um forno CTO-30AC (30C), DAD SPD-M20A, e controladora CBM-20A; MS Esquire HCT, Bruker Daltonics, do tipo *íon trap*, com fonte de ionização por *electrospray*; controlados pelos softwares LC-solution e Esquire control versão 6.2, respectivamente). Colunas semi-preparativa Luna Sílica, 250x10mm e MAX-RP 150x2,0mm da Phenomenex (Torrance, C.A., USA).

Foi utilizado também um sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) Shimadzu, com a controladora SCL-10A VP, injetor automático SIL-10AF, duas bombas LC-10A VP, degaseificador DGV – 14ª, detector de fluorescência RF-10A VL e detector de arranjo de diodos SDP-M 10A. HPLC preparativo, SHIMADZU SCL-10A VP acoplado a um coletor de frações FRC-10A e um detector UV-VIS. Colunas analíticas Luna C18, 5µm, 250x4,60mm da Phenomenex. Todo o sistema é controlado pelo software Class VP.

3.3 Preparo de Soluções

Segue uma lista das soluções utilizadas e alguns detalhes de preparação e conservação.

Gel de agarose 1%: 0,6g de agarose, 1,2mL de tampão TAE, 3µL de brometo de etídeo e água destilada completando o volume para 60 mL.

Gel de empilhamento para Western Blot: 670µL de acrilamida 30%, 500µL de tampão Tris HCl 1,5M pH 6,8, 40µL de SDS 10%, 2,7mL de água destilada, 4µL de TEMED e 40µL de persulfato de amônio 10%.

Gel de poliacrilamida 12%: 6mL de acrilamida 30%, 3,8mL de tampão Tris HCl 1,5M pH 8,8, 150µL de SDS 10%, 4,9mL de água destilada, 6µL de TEMED e 150µL de persulfato de amônio 10%.

Meio de cultura ágar Luria-Bertani: 10g de triptona, 5g extrato de levedura, 10g NaCl, 2,5mL NaOH 1M, 16g de agar-agar e água ultrapura completando o volume de 1000mL. Armazenamos as placas a 4°C.

Meio de cultura caldo Luria-Bertani: 10g de triptona, 5g extrato de levedura, 10g NaCl, 2,5mL NaOH 1N e água ultrapura completando o volume de 1000mL. Armazenamos a solução a 4°C.

Meio de cultura DMEM High: Dissolvemos um sachê do meio de cultura comercial em 900mL de água ultra-pura, adicionamos 3,7g de NaHCO₃ e completamos o volume para 1000mL, com água. Ajustamos para pH 7,2. Filtramos e adicionamos 1% de antibiótico (ampicilina + estreptomicina). Armazenamos a 4°C. No momento do uso, adicionamos 10% de SFB.

Meio FB: 10g de glicerol, 0,745g de KCl, 0,73g CaCl₂, 0,098g de KAc para obtenção de um volume de 10mL. Ajustar para pH 6,2 com HCl.

Meio SOB: 0,4g de triptona, 0,1g de extrato de levedura, 0,1g de NaCl, completando o volume para 20mL com água destilada.

Meio SOC: 400µL de meio SOB adicionados de 8µL de glicose e 4 µL de MgCl₂

Ponceau 0,1%: 0,1g de Ponceau S, 30mL de ácido acético glacial e água ultrapura até completar o volume de 100mL. A solução foi armazenada a temperatura ambiente.

Solução corante de azul de Coomassie: 0,625g de azul de Coomassie R-250, 33mL de ácido acético glacial, 113,5mL de metanol e 146mL de água ultrapura

completando o volume para 300mL. Armazenamos a solução a temperatura ambiente em frasco âmbar.

Solução de 1-metil-triptofano (1mM): 2,2mg de 1-metil-triptofano em 10mL de água ultrapura. Aliquotamos e estocamos a -20°C.

Solução de ácido tricloroacético 30%: 3g de ácido tricloroacético em 10mL de água ultrapura. Aliquotamos e armazenamos a -20°C.

Solução de acrilamida 30%/ bis-acrilamida 0,8%: 30g de acrilamida, 0,8g de bis acrilamida em 100mL de água ultrapura. Filtramos a solução em filtros com poros de 0,45µm e estocamos em frasco escuro a 4°C.

Solução de ampicilina (100mg/mL): 100mg de ampicilina em 1mL de água ultrapura. Aliquotamos e estocamos a -20°C.

Solução de ascorbato (200mM): 352,2mg de ácido ascórbico em 10mL de água ultrapura. Acertamos o pH da solução para 6,5, aliquotamos e armazenamos a -20°C.

Solução de azul de metileno (0,5mM): 1,9mg de azul de metileno em 10mL de água ultrapura. Aliquotamos e armazenamos a -20°C.

Solução de bloqueio para blotting da proteína recombinante humana IDO: 0,2g de leite desnatado, 400µL de SFB em 20mL de TBS-T.

Solução de catalase para ensaio de atividade de IDO (5mg/mL): 5mg de catalase em 1mL de água ultrapura. Aliquotamos e armazenamos a -20°C.

Solução de EDTA 0,5M: 14,6g de EDTA em 100mL de água ultra-pura. Acertamos para pH 8,0 e armazenamos a 4°C, protegido da luz.

Solução de imidazol (1M): 0,68g de imidazol em 10mL de água ultrapura. Aliquotamos e estocamos a 4°C.

Solução de IPTG (100 mM): 23,8mg de IPTG em 1mL de água ultrapura.

Aliquotamos e estocamos a -20°C.

Solução de lauril sulfato de sódio 10% (dodecil sulfato de sódio – SDS): 1g de SDS

em 10mL de água ultrapura. Armazenamos a temperatura ambiente.

Solução de lisozima (10 mg/mL): 10mg de lisozima em 1mL de água ultrapura.

Estocamos a -20°C.

Solução de MTT 5mg/mL: 5mg de MTT em 1mL de água ultra-pura. Armazenamos

por no máximo uma semana, a 4°C, protegida da luz. No momento do uso, diluímos na proporção de ¼ em meio de cultura.

Solução de NaOH (1M): 0,4g de NaOH em 10mL de água ultrapura. Estocamos a

solução a 4°C.

Solução de TBS/ tween 20 0,1% para blotting de MPO e IDO intracelular: 0,3mL de

tween 20 em 300mL de TBS. Armazenamos a solução a 4°C.

Solução de persulfato de amônio 10%: 0,5g de persulfato de amônio em 5mL de

água ultrapura. Aliquotamos e estocamos a -20°C.

Solução de PMSF (100mM): 0,17g de PMSF em 10mL de etanol P.A. Aliquotamos e

estocamos a -20°C.

Solução de QUIN (2mM): 2,1mg de QUIN em 5,0mL de água ultrapura. Aliquotamos

e estocamos a -20°C.

Solução de tripsina 0,25%: 8,18g de NaCl, 200mg de KCl, 1,14g de Na₂HPO₄ anidro,

200mg de KH₂PO₄, 2mL de solução de EDTA 0,5M, 10mg de vermelho de fenol e água em quantidade suficiente para o volume final de 900mL. Acertamos para pH 7,0 e filtramos. Adicionamos 50mL de tripsina 2,5% a 450mL do tampão acima.

Solução de triptamina (10mM): 1,6mg de triptamina em 1mL de MeOH grau HPLC.

Estocamos a 4°C, protegido da luz.

Solução de triptofano (10mM): 20,4mg de triptofano em 10mL de água ultrapura.

Aliquotamos e estocamos a -20°C.

Solução de triptofano (5mM): 10,2mg de triptofano em 10mL de água ultrapura.

Aliquotamos e estocamos a -20°C.

Solução descorante para gel de poliacrilamida: 7,5mL de ácido acético glacial,

5,0mL de metanol e completamos o volume de 100mL com água ultrapura.

Armazenamos a temperatura ambiente em frasco âmbar.

Tampão da amostra para proteínas 5x (Tris HCl 60mM, glicerol 25%, SDS 2%, β

mercaptoetanol 14,4mM, azul de bromofenol 0,1% pH 6,8): 72,7mg de trizma base,

2,5mL de glicerol, 0,2g de SDS, 0,5mL de β -mercaptoetanol, 10mg de azul de

bromofenol em água ultrapura completando o volume de 10mL. Acertamos o pH

para 6,8. Aliquotamos e estocamos a solução a - 20°C. No momento do uso, as

amostras contendo as proteínas de interesse foram diluídas com o tampão da

amostra (1:5) e incubadas em banho de água a 96°C por 10 minutos.

Tampão de corrida, pH 8,3: 3,0g de trizma base, 14,4g de glicina, 1g de SDS e

completar com água ultrapura a um volume final de 1000mL. Acertamos o pH para

8,3 e estocamos em frasco escuro a 4°C.

Tampão de equilíbrio para purificação da enzima recombinante humana IDO (20mM

Tris HCl, 200mM NaCl, pH 8,0): 12,1mg de trizma base, 58,45mg de NaCl

completando o volume com água ultrapura até 5mL. Estocamos a 4°C.

Tampão de lavagem para purificação da enzima recombinante humana IDO (20 mM

Tris HCl, 200 mM NaCl 10% glicerol, pH 8,0): 24,2mg de trizma base, 116,9mg de

NaCl, 1,0g de glicerol e água ultrapura completando o volume da solução para

10,0mL. Armazenamos a 4°C.

Tampão de lise bacteriana (Tris HCl 20mM, NaCl 200mM, 1mg/mL de lisozima, 1mM de PMSF pH 8,0): 24,2mg de trizma base, 116,9mg de NaCl, 10mg de lisozima, 100 μ L de PMSF (solução estoque de 100mM) em água ultrapura completando o volume para 10mL. O pH da solução foi ajustado para 8,0 e a solução foi aliquotada e estocada a -20°C.

Tampão de transferência: 3,0g de trizma base, 14,0g de glicina, 200mL de metanol e completamos com água ultrapura até completar o volume para 1000mL. Armazenamos a 4°C em frasco ambar.

Tampão de Tris HCl 0,25M, SDS 0,2%, pH 6,8 para blotting de IDO recombinante humana: 3,0g de Trizma base, 20mg de SDS em 100mL de água ultrapura. Acertamos o pH para 6,8 e estocamos a 4°C.

Tampão de Tris HCl 0,75M, SDS 0,2% pH 8,8 para blotting de IDO recombinante humana: 9,1g de Trizma base, 20mg de SDS em 100mL de água ultrapura. Acertamos o pH para 8,8 e estocamos a 4°C.

Tampão fosfato de potássio 0,5M, pH 6,5 (atividade enzimática): 2,7g de K₂HPO₄ em 40mL de água ultrapura. Acertamos o pH para 6,5, aliquotamos e estocamos a -20°C.

Tampão fosfato salina (PBS): 2,78g de Na₂HPO₄.12 H₂O, 0,301g de KH₂PO₄, 8,1g de NaCl, 0,2g de KCl e água ultrapura completando o volume para 1000mL. Acertamos o pH para 7,4 e armazenamos a solução a 4°C em frasco âmbar.

Tampão tris salina (TBS) (0.05M Tris Base, 0,9% NaCl, pH 7.6): 121mg de Trizma base, 876,6mg de NaCl e água ultrapura completando o volume para 100mL. Acertamos o pH para 7,6 e armazenamos a solução a 4°C em frasco âmbar.

Tampão tris salina tween (TBS-T) (0.05M Tris Base, 0,9% NaCl, 0,1% de tween 20, pH 7.6): 121mg de Trizma base, 876,6mg de NaCl e água ultrapura completando o

volume para 100mL. Acertamos o pH para 7,6 e armazenamos a solução a 4°C em frasco âmbar.

3.4 Síntese de DMT

A síntese de DMT foi realizada a partir da triptamina baseando-se na rota descrita por Bosch e colaboradores [131], com algumas modificações. Inicialmente, 2mmol de triptamina foi dissolvida em MeOH em um balão de três bocas imerso em banho de gelo. Ao balão foram adicionadas simultaneamente e por gotejamento, soluções de formaldeído (3mL, 32mmol) em MeOH (3mL) e NaBH₄ (380mg, 10mmol) em H₂O (6mL), ficando a solução final sob agitação por 30 minutos, a 0°C. Adicionou-se então HCl 2N para acidificar o meio, até atingir pH 3 e a solução permaneceu sob agitação por mais 10 minutos, a 0°C. Depois desse tempo, o meio foi alcalinizado adicionando-se NaHCO₃ até atingir pH 7, a fim de se evitar a degradação do DMT já sintetizado. A solução foi então passada para um balão de uma boca e o MeOH foi seco em rota vapor a 42°C, por 40 minutos. À solução aquosa que ainda restou no balão, foram adicionados mais 10mL de água e NaHCO₃ em excesso, a fim de desprotonar as aminas da solução, fazendo com que fossem para a fase orgânica durante a extração, que ocorreu adicionando-se 50mL de acetato de etila em funil de separação. A fase orgânica foi retirada e a fase aquosa foi extraída novamente com mais 50mL de acetato de etila, processo repetido por mais duas vezes. Toda a fase orgânica obtida foi passada para um erlenmeyer e à ela foi adicionado sulfato de magnésio em excesso para a retirada de qualquer traço aquoso que por ventura tivesse presente. A solução foi então filtrada em papel de filtro, colhida em balão e o solvente seco em rota vapor, a 42°C. Depois

de seco, o produto de síntese foi armazenado em geladeira para que fosse posteriormente purificado.

3.5 Purificação e identificação do DMT

O produto de síntese foi inicialmente analisado em HPLC, com coluna analítica Luna C18, 250x4,60mm, com partículas de 5µm, utilizando MeOH : água + 0,1% ácido fórmico como fase móvel, em fluxo de 1mL por minuto. O método executado foi o seguinte: manteve-se a concentração de 10% de MeOH por 7 minutos, sendo posteriormente elevada linearmente até 80% em 1 minuto; depois de mantida por 2 minutos nessa concentração, baixou-se também linearmente para 10% em 1 minuto, concentração que permaneceu por mais 9 minutos para o condicionamento da coluna. Foram injetados 5µL do produto de síntese dissolvido em MeOH sendo observado um único pico em 6,5 minutos, em 288nm. A purificação do produto de síntese foi feita também em HPLC, com coluna semi-preparativa Luna Sílica, 250x10mm, com partículas de 5µm, em método isocrático utilizando hexano:acetato de etila (65:35) como sistema solvente, a um fluxo de 4,5mL por minuto, em 288nm. Foram injetados 200µL de amostra por corrida e o pico, coletado automaticamente no tempo de retenção de 9 minutos, em 288nm.

O produto de síntese, após purificado, foi identificado em LC/MS do tipo *ion trap* por uma fonte de ionização por *electrospray*, operada no modo positivo (ESI+). Ao final do processo, o material foi seco em speed-vac, fornecendo 15,3mg de DMT puro.

3.6 Quantificação de DMT

Devido à ausência de dados com relação à absortividade (ϵ) do DMT, que prejudica o cálculo da concentração de uma solução deste composto pela lei de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot l \cdot c$, sendo A = absorvância, ϵ = absortividade, l = caminho óptico percorrido pela luz, e c = concentração), a quantificação teve que ser feita diante da pesagem do precipitado formado após a secagem do solvente em que estava dissolvido (MeOH). Um eppendorf estéril foi inicialmente pesado e, após a secagem do solvente em speedvac, pesado novamente, sendo a diferença de peso correspondente à massa de DMT que estava contida na solução inicial. De posse desse valor, foram feitas soluções de concentrações conhecidas em MeOH, que permaneceram estocadas sob refrigeração e protegidas da luz. Devido ao fato do MeOH ser um solvente extremamente volátil, fato que poderia prejudicar a fidedignidade da concentração das soluções estoque de DMT, o processo de quantificação descrito acima era repetido imediatamente antes de qualquer experimento envolvendo DMT.

3.7 Obtenção de bactérias (BL21 e DH5- α) competentes por ação de CaCl_2

Um pré-inóculo foi preparado utilizando uma colônia de bactéria em 3mL de caldo LB sem antibióticos e incubado O.N. a 37°C, sob agitação. No dia seguinte, 1mL do pré-inóculo foi diluído em 62,5mL de caldo LB e mantido sob agitação até atingir OD_{600} de 0,4 – 0,6. Após repouso em gelo por 60 minutos, foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o pellet, seco. O pellet foi então ressuspenso em meio FB e deixado em gelo por mais 60 minutos. A suspensão de

bactérias foi novamente centrifugada e ressuspensa em meio FB para armazenamento.

3.8 Digestão do plasmídio pRSET B

O plasmídeo e o produto de PCR foram digeridos com as enzimas Xho I e EcoRI na proporção de 10 U por micrograma de DNA a ser digerido. A reação ocorreu O.N. em banho de água a 37°C. Após a digestão foi feito gel de agarose 1%.

3.9 Transformação de cepas DH5- α competentes para clonagem de DNA

Foram incubados 1 μ L do plasmídeo pRSET B-IDO com 20 μ L de células competentes DH5- α por 30 minutos em gelo. Em seguida as células foram incubadas por 2 minutos a 42°C para ativação das células competentes. Após esse tempo foram adicionados 400 μ L de meio SOC e novamente incubados a 37°C por 1 hora. Todo o volume foi plaqueado em meio ágar LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina. A placa foi incubada a 37°C em estufa por 18 horas e observamos o crescimento de colônias isoladas.

3.10 Extração de DNA plasmidial por lise alcalina ("medium prep")

Uma colônia da bactéria DH5- α foi inoculada em 70mL de caldo LB/ampicilina 100 μ g/mL por 18 horas a 37°C. Após esse tempo, a suspensão de bactérias foi centrifugada numa rotação de 6000rpm por 10 minutos a 4°C e em seguida, o pellet, ressuspensa em 3,0 mL de uma solução contendo glicose 50 mM, tris HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM e 6,0 mL de solução de NaOH 0,2 M, SDS 1%. Depois de

incubado em gelo por 10 minutos, foram adicionados 4,5mL de $\text{KC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 3M e $\text{HC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 5M e novamente incubado, por mais 15 minutos. A suspensão foi então centrifugada a 8000rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante filtrado em gaze. Ao volume filtrado foram acrescentados mais 2 volumes de etanol absoluto à temperatura ambiente, incubado por 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugado a 8000rpm por 10 minutos a 4°C e o precipitado seco a temperatura ambiente. O pellet foi ressuspensão em 200µL de TE (tampão Tris-EDTA), 2µL de NaCl 5 M e 20µL de RNase (10 mg/mL) e incubado a 37°C por 30 minutos. Adicionou-se mais 4µL de SDS 10% e 2µL de proteinase K e incubou-se novamente por 30 minutos a 37°C. Foi feita uma extração com fenol:clorofórmio (1:1), com centrifugação a 13.000rpm por 3 minutos a temperatura ambiente, para a retirada da RNase e da protease, sendo coletada a fração superior. Essa, após adição de clorofórmio (1:1), foi centrifugada também a 13.000rpm por 3 minutos a temperatura ambiente, para a retirada do fenol, sendo separada a fração superior. A ela foram adicionados 100µL de $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}$ 7,5 M, 600µL de etanol absoluto gelado e a solução centrifugada a 12.500rpm por 15 minutos a 4°C. Acrescentou-se 500µL de etanol 70% gelado e agitou-se até o precipitado desgrudar do fundo do tubo. Depois de uma nova centrifugação a 12.500rpm por 5 minutos a 4°C, o pellet foi seco deixado em repouso até que secasse a temperatura ambiente e em seguida foi ressuspensão em 50µL de TE. Para confirmação da extração foi realizado gel de agarose 1%, usando padrão de tamanho molecular tipo fago λ -Hind III.

3.11 Transformação de cepas BL21 competentes para a expressão da proteína

Foram incubados 100 µL de células competentes com 5 µL de plasmídeo pRSET B-IDO (50 ng) em gelo por 30 minutos. Passado esse tempo, foi dado um

choque térmico nas bactérias incubando-as por 2 minutos a 42°C e em seguida no gelo por mais 5 minutos. Após essa etapa, foram adicionados 400µL de meio SOC, agitados e deixados os tubos a 37°C por 1 hora. Todo o volume da reação foi plaqueado em ágar LB com 100µg/mL de ampicilina e incubado *overnight* a 37° C em estufa.

3.12 Expressão de proteína recombinante em pequena escala

Para a clonagem e expressão, foi utilizado como referência o trabalho de Littlejohn T.K. e colaboradores [132], com pequenas alterações feitas por nosso grupo [133]. Uma colônia isolada de bactéria recombinante *E. coli* BL-21, contendo o plasmídeo pRSET B – IDO foi adicionada a 4,0mL de caldo LB/ampicilina 100µg/mL e incubada por 18 horas, a 37° C sobre agitação (200rpm) para saturação do meio de cultura. Foram inoculados 1,5mL do meio saturado em 15mL de caldo LB/ampicilina 100µg/mL até atingir OD₆₀₀ =1,2. A cultura foi induzida com IPTG 0,1mM a 30° C, 200rpm por 18 horas. Após centrifugação deste material a 8000rpm por 15minutos a 4°C, as bactérias foram ressuspensas em 0,5mL de tampão de sonicação com lisozima (1mg/mL) e PMSF (1,0mM). A preparação foi sonicada durante 30 segundos por 3 vezes, imersa em gelo. Após centrifugação a 10.000g por 15 minutos, foi feita a ressuspensão do pellet em 0,5mL de PBS. Foi realizado o SDS-page (12%) para verificação da presença da proteína recombinante.

IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) é um composto que é molecularmente semelhante à alolactose, um metabólito da lactose que inicia a transcrição do operon lac. O IPTG induz a atividade da enzima beta-galactosidase, que promove a utilização da lactose, pela ligação e inibição do repressor lac.

3.13 Expressão de proteína recombinante em média escala

Uma colônia isolada de bactéria recombinante BL-21 , contendo pRSET B – IDO, foi adicionada a 20mL de caldo LB/ampicilina 100µg/mL e incubada por 18 horas a 37° C sobre agitação (200rpm). Foram inoculados 20mL da solução bacteriana saturada em 180mL de caldo LB/ampicilina 100µg/mL (diluição 1:10), e mantida sob agitação até atingir $OD_{600} = 1,1 \sim 1,3$. A expressão foi induzida com IPTG 0,1mM durante 18 horas (O.N.) a 30°C sob agitação. Após esse tempo, foi centrifugada a 3500rpm por 15 minutos a 4° C e as bactérias foram ressuspensas em 10mL de tampão de sonicação suplementado com lisozima (1mg/mL) e PMSF (1,0mM). A preparação foi incubada no gelo por 30 minutos e sonicada 2 vezes por 1 minuto e 2 vezes por 30 segundos para evitar que a temperatura ultrapasse 40°C. Em seguida o material foi centrifugado a 14.000rpm por 1 hora e o sobrenadante, utilizado para a purificação da proteína recombinante.

3.14 Expressão de proteína recombinante em grande escala

Uma colônia isolada de bactéria recombinante BL-21 , contendo pRSET B – IDO, foi adicionada a 240mL de caldo LB/ampicilina 100µg/mL e incubada por 18 horas a 37° C sobre agitação (200rpm). Foram inoculados 200mL da solução bacteriana saturada em 1,8L de caldo LB/ampicilina 100µg/mL (diluição 1:10), e mantida sob agitação até atingir $OD_{600} = 1,1 \sim 1,3$. A expressão foi induzida com IPTG 0,1mM durante 18 horas (O.N.) a 30°C sob agitação. Após esse tempo, foi centrifugada a 4000rpm por 30 minutos a 4° C e as bactérias foram ressuspensas em 50mL de tampão de sonicação suplementado com lisozima (1mg/mL) e PMSF

(1,0mM). A preparação foi incubada no gelo por 30 minutos e sonicada 4 vezes por 3 minutos. Em seguida o material foi centrifugado a 14.000rpm por 1 hora e o sobrenadante, utilizado para a purificação da proteína recombinante.

3.15 Purificação da proteína recombinante em grande escala

Para purificação da enzima IDO recombinante humana foi utilizada coluna de Níquel Sepharose em sistema de empacotamento de resina em coluna. A resina é comercializada diluída em etanol 20% na proporção de 1:1, sendo assim, 1 volume de coluna (VC), isto é, 1mL de solução homogênea da resina, correspondente a 0,5mL de resina. Para a purificação de 50mL de solução de proteína foram utilizados 2VC de resina e o fluxo foi controlado por bomba peristáltica. A resina foi lavada com 40VC (20mL) de água ultra-pura. Em seguida foram adicionados 40VC de tampão de equilíbrio. A solução de proteína interagiu com a coluna num fluxo de 0,3mL/min, sendo coletada a fração que passou pela coluna. A resina foi lavada com 80VC (40mL) de tampão de lavagem e frações de 4mL foram coletadas. A eluição se deu diante de um gradiente de concentração de imidazol, cujas concentrações foram 10mM, 30mM, 50mM, 80mM, 100mM, 150mM, 200mM, 250mM e 300mM. Foram passados 40VC (20mL) de cada solução de imidazol e coletadas as respectivas frações. A eluição da proteína de interesse aconteceu entre 80mM e 100mM de imidazol. Todas as frações coletadas foram analisadas em gel de poliacrilamida 12%, podendo ser observada a presença da proteína de interesse pura nas frações de 80 a 100mM de imidazol (Figura 14).

Figura 14: Gel de poliácridamida 12% resultante da purificação da enzima rIDO por coluna de níquel demonstrando bandas em 45kDa. Frações decorrentes da eluição, que ocorreu entre 80mM e 100mM de imidazol.

Depois de purificada, a amostra foi concentrada utilizando-se filtros de 30 kDa (Microcon®), garantindo além da concentração da amostra, a retirada do imidazol da solução. A proteína expressa foi armazenada a -20°C, protegida da luz.

3.16 Quantificação de proteína expressa

A quantificação de proteínas foi feita apenas das frações que demonstraram presença de proteína com peso molecular de 45kDa no gel de acrilamida, feito após a purificação. O método utilizado foi Bradford, adicionando solução de BSA como padrão para a confecção das curvas de calibração (feitas em triplicata). Os pontos da curva de calibração e as amostras foram diluídos com PBS e, em seguida foram adicionados 200µL de reagente de Bradford, numa diluição final de 1:5. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 595nm e revelaram expressão de 1,25mg de proteínas. Na figura 15 está representada a curva de calibração utilizada nos cálculos de quantificação.

Figura 15: Curva de calibração utilizada para os cálculos de quantificação de proteínas pelo método de Bradford. BSA foi utilizado como padrão.

3.17 Western blotting da IDO expressa

O gel de poliacrilamida foi feito a 12% e a corrida se deu a uma voltagem constante de 150V por 1 hora e 15 minutos. Em seguida, a proteína foi transferida a uma membrana de nitrocelulose em corrida com voltagem constante de 100V, por 1 hora e 45 minutos, em banho de gelo, não permitindo-se o alcance da amperagem de 300mA. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de TBS acrescida de 0,1% de tween 20, 2% de soro fetal bovino e 1% de leite desnatado, em temperatura ambiente, sob agitação. Depois de lavada três vezes com TBS-T, foi incubada com o anticorpo primário monoclonal anti-IDO, diluído 1:200 com solução de TBS-T + 0,5% de leite desnatado, por 18 horas sob agitação e refrigeração. Percorrido esse tempo, a membrana foi lavada novamente com TBS-T e incubada por mais 1 hora e 30 minutos, sob agitação e refrigeração, com o anticorpo secundário (anti-goat) marcado com HRP, diluído 1:1000 com a mesma solução utilizada para o bloqueio. Depois de lavada três vezes com TBS-T, o western foi então revelado com luminol no equipamento ImageQuant 400 (Figura 16).

Figura 16: Western blotting da rIDO. 1- Amostra concentrada; 2- amostra não concentrada.

3.18 Atividade de IDO

A atividade da enzima IDO foi analisada monitorando-se a formação de QUIN, o segundo produto da via das quinureninas. Para isso foi utilizado como base o ensaio de atividade previamente descrito por Yamamoto & Hayashi [134]. As reações aconteceram a 37°C e eram composta por tampão fosfato de potássio pH 6,5 (50mM), substrato L-TRP (200μM), ativadores da enzima como ácido ascórbico (20mM) e azul de metileno (10μM), catalase (100μg/mL) para degradação de H₂O₂ formado pela dismutação espontânea de O₂⁻, e enzima IDO (0,2μg/reação para ensaio de K_M e 0,5μg/reação para ensaios de inibição). A reação enzimática era iniciada adicionando-se a enzima e cessada após 30 minutos com adição de 6% de ácido tricloroacético. Toda a N-formil-quinurenina (NFK), primeiro produto da via das quinureninas, era deformilada a QUIN após 15 minutos de incubação a 65°C. As amostras eram centrifugadas a 13.000g a 4°C por 10 minutos e filtradas em membranas de 0,22μm de poro para posterior análise em HPLC. Um branco de reação foi feito sem a presença da enzima para monitorar principalmente a contaminação de QUIN.

3.19 Influência dos solventes MeOH e DMSO na atividade de IDO

Ao ambiente de reação de atividade de IDO descrito no item 3.18, foram adicionadas concentrações crescentes de MeOH (0, 2, 6, 10, 20 e 30) ou DMSO (0, 1, 5, 10 e 15µL), utilizando a enzima numa concentração de 0,5µg/reação. O tempo e a temperatura de reação, assim como todos os demais procedimentos, foram realizados conforme descrito no item 3.18.

3.20 Ensaio de inibição da atividade de IDO

Os ensaios de inibição foram realizados de acordo com a atividade de IDO descrita no item 3.18, na presença dos possíveis inibidores DMT (720µM) e TRY (500µM). A produção de QUIN foi monitorada por HPLC conforme o item 3.23.

3.21 Ensaio de DMT e TRY como substratos de IDO

Foi analisada a possibilidade de DMT e TRY serem substratos da IDO. Para isso foi utilizado o ensaio clássico de IDO (conforme protocolo descrito no item 3.18) com a modificação do substrato, ao invés de TRP, adicionou-se DMT ou TRY nas concentrações de 16,6µM, 35µM, 70µM, 100µM e 200µM, com 0,5µg de IDO/reação. A análise foi feita por LC-MS, utilizando coluna MAX-RP, 150x2,0mm, com partículas de 4µ da Phenomenex. A fase móvel foi composta por (A) formiato de amônio 5mM + 0,5% ácido fórmico : (B) MeOH, com vazão de 200µL/min, seguindo o seguinte método: nos primeiros três minutos, manteve-se a concentração de B em 5%, nos 12 minutos seguintes elevou-se linearmente a concentração para 60% e nos próximos dois minutos, para 90%, mantendo-se por mais três minutos; em

seguida, a concentração de B foi reduzida novamente a 5% em um minuto, sendo mantida pelos 14 minutos seguintes, para o condicionamento da coluna. Foi utilizado N_2 a 30psi como gás de nebulização e N_2 a 6L/min a 280°C, como gás secante. A fonte de ionização foi por electrospray, operado no modo positivo a 4000V. Foram feitos scan de m/z 50 a 700 e os espectros de MS2 foram obtidos usando gás hélio como gás de colisão. O branco de reação foi feito na ausência dos substratos, e como controle positivo foi utilizada a reação de IDO com TRP, levando à formação do produto de abertura de anel, QUIN.

3.22 Ensaio cinéticos da enzima IDO

Para os ensaios cinéticos da IDO recombinante humana, foi utilizado o protocolo clássico somente com a alteração da concentração de substrato e de inibidor, de acordo com Segel, I.H. [135]. Para o cálculo de K_M de L-TRP, foram utilizados 0,2 K_M – 2 K_M do K_M descrito na literatura ($K_M = 35\mu M$), ou seja, as concentrações de 17,5 μM , 35 μM , 70 μM e 105 μM . Para o cálculo de K_i é exigido também a faixa de 0,2 K_i - 2 K_i , sendo assim, para 1-MT cujo K_i médio é de 35 μM , foram utilizadas as mesmas concentrações de TRP. Para a análise do K_i dos possíveis inibidores, foram utilizadas as concentrações de TRP de 17,67 μM , 35 μM , 70 μM e 105 μM e as concentrações de DMT iguais a 0 μM , 250 μM , 350 μM , 500 μM e 700 μM , e de TRY iguais a 0 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM , e 500 μM . A formação de QUIN foi monitorada por HPLC conforme item 3.23.

Os dados cinéticos (velocidade de reação (nmol/min) x concentração de substrato (μM)) foram analisados pelos gráficos de Lineweaver-Burk (1/velocidade

de reação ((nmol/min)⁻¹) x 1/ concentração de substrato ((μM)⁻¹) e replot de $V_{\max}^{-1}$ x concentração do inibidor.

3.23 Identificação e quantificação de TRP, NFK e QUIN

As reações descritas anteriormente contendo TRP, NFK e QUIN foram analisadas injetando-se 40μL de amostra em sistema de HPLC, utilizando coluna analítica Luna C18, 250x4,60mm, com partículas de 5μm. O método utilizado tinha duração de 35 minutos, em fluxo de 1ml/min de fase móvel composta por água:acetonitrila em sistema gradiente. Durante os 22 primeiros minutos do método a concentração de ACN foi elevada linearmente de zero a 10%; durante os três minutos seguintes a concentração de ACN foi novamente decrescida linearmente de 10% a zero, sendo mantida em zero por 10 minutos para o condicionamento da coluna. A análise dos componentes das amostras foi feita por detectores de arranjo de diodos e fluorescência, nos comprimentos de onda (λ) de 288nm, 325nm e 365nm, utilizados para a detecção de TRP, NFK e QUIN, respectivamente. O limite de detecção foi de 244 nM e o limite de quantificação foi de 488 nM tanto para TRP quanto para QUIN. Nas condições utilizadas a relação do sinal com a concentração se mostrou linear na faixa analisada ($19,53 \times 10^{-4}$ – 2 mM) (Figura 17).

Figura 17: Curva padrão de QUIN. A análise foi feita entre as concentrações de $19,53 \times 10^{-4}$ e 2,0

mM. O composto se mostrou linear nas concentrações avaliadas.

3.24 Ensaio em células

Todos os ensaios em células foram realizados entre o 4º e 8º dia de cultura, intervalo que, de acordo com Knebel, F.H. [136], compreende a fase log de crescimento dessa linhagem celular.

Os compostos analisados, DMT e TRY, foram utilizados nos ensaios em células dissolvidos em DMSO, a uma concentração final deste de 1%. Essa concentração foi considerada segura para utilização em cultura celular por Coimbra, J. B. [130], em análise feita por citometria de fluxo, através do método de incorporação de iodeto de propídeo.

3.24.1 Viabilidade celular pelo método de MTT

Foram plaqueadas 1×10^4 células/mL (glioblastoma A172) em placa de 96 well, num volume final de 200µL de meio de cultura DMEM High, acrescido de 1% de antibiótico e 10% de soro fetal bovino (SFB). 1-MT (1-metiltryptofano), inibidor clássico de IDO, foi utilizado no experimento a título de comparação, dado que conhecidamente não apresenta citotoxicidade celular. As concentrações de TRY, DMT e 1-MT avaliadas foram 10, 50, 100 e 500µM, e foram adicionados quando as células apresentavam cerca de 60% de confluência. O teste controle foi composto por meio de cultura acrescido de 1% de DMSO. Foi feita uma solução estoque de MTT de 5mg/mL, a qual foi diluída na proporção de ¼ com meio de cultura imediatamente antes do uso. Após 48 horas da adição dos estímulos, o meio de cultura das células foi retirado e, então adicionados 200µL da solução diluída de

MTT, permanecendo a placa incubada em estufa de CO₂ por 3 horas, a 37°C. Depois desse tempo, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 200µL de DMSO. Após homogeneização dos poços, a leitura das absorbâncias foi feita em espectrofotômetro BioTek a 550nm.

3.24.2 Viabilidade celular pelo método de azul de tripan

Foram plaqueadas 5×10^4 células/well (glioblastoma A172) em placa de 24 well, num volume final de 500µL de meio de cultura DMEM High, acrescido de 1% de antibióticos e 10% de soro fetal bovino (SFB). 1-MT (1-metiltryptofano), inibidor clássico de IDO, foi utilizado no experimento como controle negativo de morte. Para TRY e 1-MT, as concentrações avaliadas foram 100 e 500µM, já para o DMT, apenas a concentração de 500µM foi testada, e foram adicionados à cultura quando as células apresentavam cerca de 60% de confluência. O teste controle foi composto apenas de meio de cultura. Após 48 horas de incubação com os estímulos, as células foram tripsinizadas utilizando 200µL de tripsina 0,25%, e alíquotas de 20µL da suspensão celular foram contadas em microscópio óptico na presença de 5µL de azul de tripan. Como o azul de tripan é um corante azul, e tem capacidade de penetrar apenas nas células mortas, com membrana celular não íntegra, as células coradas em azul foram contadas como não-viáveis.

3.24.3 Inibição enzimática em sistema com células A172

Foram plaqueadas 2×10^4 células/well (glioblastoma A172) em placa de 12 well, num volume final de 500µL de meio de cultura DMEM High, acrescido de 1% de

antibióticos e 10% de soro fetal bovino (SFB). 1-MT (1-metiltryptofano), inibidor clássico de IDO, foi utilizado no experimento como controle positivo de inibição enzimática. As concentrações de TRY analisadas foram 50 e 100µM, as de DMT foram 100 e 500µM e as de 1-MT, 50, 100 e 500µM, todos na ausência e presença de 50ng/mL de IFN-γ (indutor da enzima IDO). O teste controle foi composto apenas de meio de cultura. Os estímulos foram adicionados quando as células atingiram cerca de 60% de confluência. Após 24 horas da adição dos estímulos, foram retirados 100µL de sobrenadante e a eles adicionado 1mL de acetonitrila gelada. A mistura permaneceu imersa em gelo por 5 minutos, foi vortexada por 1 minuto e centrifugada a 12000g por 15 minutos. O sobrenadante foi seco em speed-vac, ressuspenso em 200µL de água MilliQ, filtrado em membrana de 0,22µm e a QUIN, quantificada em sistema de HPLC conforme descrito no item 3.23.

3.25 Análise estatística dos dados

Todos os dados foram avaliados por Análise de Variância (ANAVA), utilizando o teste paramétrico Scott-Knott com contrastes ortogonais, adotando-se um intervalo de confiança de 95%. Para a obtenção dos resultados estatísticos foi utilizado o software Sisvar versão 5.1 [137].

4 Resultados

4.1 Purificação do DMT

Devido à dificuldade de comercialização do DMT, por se tratar de um composto alucinógeno, fez-se necessária sua síntese em laboratório a partir da triptamina, facilmente adquirida comercialmente. A síntese se baseou na dimetilação da molécula da triptamina por reações consecutivas com formaldeído (levando à formação de iminas) e borohidreto de sódio (reduzindo as iminas a aminas), em meio ácido e em baixa temperatura, conforme protocolo descrito na seção de materiais e métodos. O composto obtido após a síntese foi injetado em sistema de HPLC, dissolvido em MeOH, e o cromatograma resultante apresentou apenas um pico, relacionado ao DMT (Figura 18), sugerindo uma eficiência de síntese superior a 90%.

Figura 18: Cromatograma resultante da injeção de 5 μ L do DMT sintetizado a partir da triptamina, diluído em MeOH. Para a obtenção do cromatograma foi utilizado método isocrático, utilizando MeOH:água + 0,1% ácido fórmico como fase móvel

Mesmo diante desse fato, procedeu-se a purificação do material, em coluna semi-preparativa, com injeção e coleta automática do pico característico do DMT. O composto purificado foi então analisado por espectrometria de massas que revelou a presença do pico característico da estrutura do DMT intacta, com m/z 189, além dos dois picos relacionados aos seus fragmentos protonados, com m/z 144 e 58 (Figura 19). A ausência de contaminantes comprovou a eficiência dos processos de síntese e purificação, que garantiram a obtenção de 15,3 mg de DMT puro.

Figura 19: **A-** Espectro de massas obtido após injeção de amostra purificada de DMT, apresentando os picos característicos de suas formas protonadas. **B-** Estruturas químicas protonadas das formas intacta e fragmentada do DMT.

4.2 Teste de atividade da enzima rIDO expressa

Para a análise da atividade da enzima rIDO, foi realizado o ensaio clássico de atividade [134] com a enzima recém purificada, analisando a formação de QUIN, seu principal produto, por HPLC. Na figura 20, observa-se a formação do pico de QUIN nas amostras contendo rIDO e triptofano, pico não observado na reação sem a enzima (dado não mostrado).

Figura 20: Cromatogramas característicos de TRP e QUIN após reação de *rIDO* com TRP. A reação ocorreu a 37°C. TRP e QUIN foram monitorados por HPLC nos comprimentos de onda de 280nm e 365nm, respectivamente. O tempo de retenção do TRP é próximo de 21 minutos e o da QUIN de 14,5 minutos.

Para a determinação do tempo ideal de reação, foi avaliada a atividade enzimática a 37°C nos tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos de incubação (Figura 21). A velocidade de formação de QUIN apresentou comportamento linear até o 30º minuto, com tendência à estabilização a partir do 45º minuto. Por este motivo foi adotado o tempo de 30 minutos para a realização dos experimentos envolvendo atividade de *rIDO*.

Figura 21: Efeito do tempo sobre a atividade de *rIDO*. A reação ocorreu a 37°C e a velocidade de formação do produto de catalise da *rIDO* (QUIN) foi determinada por HPLC.

Outra padronização necessária foi a concentração de enzima a ser utilizada para os ensaios de inibição enzimática e determinação dos parâmetros cinéticos, K_M e K_i . Para isso, foram avaliadas as concentrações de 0,1 μ g; 0,2 μ g; 0,3 μ g; 0,4 μ g e 0,5 μ g de rIDO por reação. Segundo a figura 22, a produção de QUIN foi linear até a concentração de 0,2 μ g por reação, havendo depois disso ligeira diminuição da velocidade de reação. Sendo assim, foi utilizada a concentração de 0,2 μ g de rIDO por reação para a determinação do K_M , e 0,5 μ g de rIDO por reação para os ensaios de inibição enzimática e K_i , por apresentar maior produção de QUIN, facilitando a visualização do processo inibitório.

Figura 22: Efeito da concentração de rIDO sobre a atividade de rIDO. A reação ocorreu a 37°C e a velocidade de formação do produto de catalise da rIDO (QUIN) foi determinada por HPLC.

4.3 Validação da enzima rIDO expressa

Após a expressão da enzima IDO recombinante fez-se necessária a validação da enzima, avaliando-se parâmetros cinéticos como K_M (para TRP) e K_i (para 1-MT), dados bem sedimentados na literatura e capazes de fornecer informações com relação à eficiência da enzima expressa. As figuras 23 e 24 mostram,

respectivamente, a cinética enzimática da enzima rIDO frente ao seu substrato TRP, e a cinética de inibição enzimática frente ao seu inibidor clássico, 1-MT.

Figura 23: Análise do K_M para a reação entre IDO e TRP. **A-** Curva de produção de QUIN por concentração de TRP por meio da reação da rIDO expressa, com TRP nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 μM. **B)** Plot do duplo recíproco (Lineweaver-Burk) para o cálculo do K_M .

Figura 24: Efeito de 1-MT sobre a atividade da iDO humana expressa para a determinação do K_i . A taxa de formação do produto de catalise da IDO foi determinada em meio contendo diferentes concentrações de 1MT ($\diamond$ 0 μM ; $\blacksquare$ 17,67 μM ; $\blacktriangle$ 35 μM ; $\times$ 70 μM e $\star$ 105 μM) e de L-TRP (17,67 μM ; 35 μM ; 70 μM e 105 μM). **A)** Gráfico de velocidade x substrato (Velocidade de formação de QUIN (nmol/min) x concentração de TRP (μM)), **B)** Gráfico de Lineweaver-Burk (1/velocidade de formação de QUIN (nmol⁻¹.min) x 1/concentração de TRP (μM^{-1})), no detalhe, gráfico de V_{max}^{-1} (nmol⁻¹.min)x concentração de inibidor (μM).

Os dados de cinética enzimática revelaram K_M para TRP de $19,4\mu\text{M}$ e K_i para 1-MT de $45,7\mu\text{M}$, com perfil inibitório característico da classe de inibidores competitivos. Esses dados são compatíveis com a literatura [51,112,132,138-140] e garantem a confiabilidade dos resultados de inibição e cinética enzimática que utilizaram a enzima rIDO.

4.4 Ensaio de inibição enzimática em sistema sem células

Para a execução dos experimentos de inibição enzimática utilizando DMT e TRY como possíveis inibidores de IDO, foi avaliada inicialmente a influência de solventes como MeOH e DMSO (Figuras 25 e 26) sobre a atividade enzimática. Esse passo foi dado devido à baixa solubilidade do DMT e TRY em água ou outros solventes aquosos, sendo mais solúveis nos solventes supracitados.

Figura 25: Efeito do MeOH sobre a reação de atividade de IDO. A reação ocorreu a 37°C e a velocidade de formação do produto de catalise da rIDO (QUIN) foi determinada por HPLC. (n=3)

Figura 26: Efeito do DMSO sobre a reação de atividade de IDO. A reação ocorreu a 37°C e a velocidade de formação do produto de catalise da rIDO (QUIN) foi determinada por HPLC. (n=3)

O MeOH provocou grande influência sobre a produção de QUIN, apresentando um declínio significativo na atividade enzimática já a partir da adição de 6μL até o volume de 30μL. Já o DMSO mostrou-se menos nocivo à reação, principalmente em pequenos volumes, porém também exerceu influência significativa sobre a atividade enzimática em volumes maiores. Mesmo diante disso, o MeOH foi escolhido para a realização dos ensaios de inibição enzimática por DMT, sendo adicionado num volume final de 30μL em todos os tubos do experimento, inclusive no controle. Essa escolha foi feita após ter sido observada degradação do DMT quando dissolvido em DMSO e armazenado a -20°C. A escolha pelo volume de 30μL foi feita devido à grande variação de resposta observada nos tubos em que foram pipetados volumes muito reduzidos de MeOH. Para os ensaios com TRY foi utilizado o DMSO como solvente, a um volume final de 8μL, adicionados também ao controle.

Para a avaliação do efeito causado pelo DMT e TRY sobre a velocidade de reação da IDO foram escolhidas as concentrações de 720μM de DMT e 500μM de TRY. De acordo com a figura 27, DMT e TRY interferiram de maneira significativa na velocidade de reação, sendo maior a influência causada pela TRY. É importante

salientar que a TRY reduziu em cerca de 50% a velocidade de formação de QUIN, mesmo estando em concentração inferior à do DMT.

Figura 27: Inibição enzimática exercida pelo DMT e pela TRY, ambos dissolvidos em MeOH. (n=3; (*)p=0,030; (**)p=0,002).

Diante da redução significativa da velocidade de reação da IDO causada pelo DMT e TRY, foi avaliada a possibilidade desses compostos atuarem como substratos da enzima. Baseando-se na atividade dioxigenásica da IDO e em dados de metabolismo do DMT já descrito na literatura [28, 29, 30], pode-se prever que os possíveis metabólitos gerados por sua reação com DMT ou TRY são compostos formilados e deformilados resultantes da abertura do anel indólico, conforme demonstrado na figura 28. Para verificar se houve formação desses compostos, DMT e TRY foram adicionados à reação clássica de IDO, na ausência de TRP, e os produtos de reação foram analisados por LC-MS.

Figura 28: Possíveis produtos formilados e deformilados, do DMT e TRY, respectivamente.

De acordo com as figuras 29C e 29D, não foram observados picos adicionais para as reações de IDO com DMT ou TRY quando comparadas ao branco de reação (Figura 29A), contrariamente ao observado para a reação de IDO com TRP (Figura 29B). A presença de TRP, QUIN, DMT e TRY foi identificada através de seus espectros de UV e MS característicos (Figuras 29E – L). Os íons específicos dos possíveis metabólitos formilados e deformilados do DMT, com m/z 207 e 179, e da TRY, com m/z 193 e 165, respectivamente, não foram identificados.

Figura 29: Cromatogramas do pico base (LC-MS) para a análise da reação de IDO com TRP, DMT e TRY. (A) Branco de reação (reação sem substratos nem IDO); (B) Controle positivo – reação entre IDO e TRP com a formação de produto de abertura de anel -QUIN); (C) Reação entre IDO e DMT; (D) Reação entre IDO e TRY. À direita, espectros UV e MS correspondentes aos picos indicados nos cromatogramas, referentes ao TRP (E e F), QUIN (G e H), DMT (I e J) e TRY (K e L). Ambos os compostos foram analisados na concentração de 100 μ M.

Mesmo diante do aumento da concentração dos possíveis substratos, os íons específicos dos possíveis metabólitos não foram identificados, sendo detectadas somente as moléculas intactas do DMT e TRY, com m/z 189 e 161, respectivamente (Figura 30).

Figura 30: Cromatogramas de íons extraídos para m/z 189, correspondente à molécula intacta de DMT (A) e m/z 161, correspondente à molécula intacta de TRY (B). Estão ilustradas as concentrações de 16,6 μM , 35 μM , 70 μM , 100 μM e 200 μM para cada composto, ambas na presença de 0,5 μg de IDO.

4.5 Cinéticas enzimáticas de inibição em sistemas sem células

Uma vez que foi demonstrada ausência de relação enzima-substrato entre DMT e TRY e a enzima IDO (Figuras 29 e 30), conclui-se que a redução na velocidade enzimática gerada por esses compostos (Figura 27) se deve somente à

ação inibitória exercida por eles. Sendo assim, foram avaliadas as cinéticas enzimáticas de inibição do DMT e da TRY, conforme demonstrado nas figuras 31 e 32.

Figura 31: Efeito de DMT (dissolvido em MeOH) sobre a atividade da IDO humana recombinante expressa para a determinação do K_i . A taxa de formação do produto de catalise da IDO foi determinada em meio contendo diferentes concentrações de DMT ($\diamond$ $0 \mu\text{M}$; $\blacksquare$ $250 \mu\text{M}$; $\blacktriangle$ $350 \mu\text{M}$; $\times$ $500 \mu\text{M}$ e $\ast$ $700 \mu\text{M}$) e de L-TRP ($17,67 \mu\text{M}$, $35 \mu\text{M}$, $70 \mu\text{M}$ e $105 \mu\text{M}$). **A-** Gráfico de velocidade x substrato (Velocidade de formação de QUIN (nmol/min) x concentração de TRP (μM)),

B- Gráfico de Lineweaver-Burk ($1/\text{velocidade de formação de QUIN (nmol}^{-1}.\text{min)}$ x $1/\text{concentração de TRP (}\mu\text{M}^{-1}\text{)}$), no detalhe, gráfico de V_{max}^{-1} ($\text{nmol}^{-1}.\text{min}$) x concentração de inibidor (μM).

Figura 32: Efeito de TRY (dissolvida em DMSO) sobre a atividade da IDO humana recombinante expressa para a determinação do K_i . A taxa de formação do produto de catalise da IDO foi determinada em meio contendo diferentes concentrações de TRY (♦ 0 μM ; ■ 100 μM ; ▲ 150 μM ; x 200 μM e * 500 μM) e de L-TRP (17,67 μM , 35 μM , 70 μM e 105 μM). **A)** Gráfico de velocidade x substrato (Velocidade de formação de QUIN (nmol/min) x concentração de TRP (μM)), **B)** Gráfico de Lineweaver-Burk ($1/\text{velocidade de formação de QUIN (nmol}^{-1}.\text{min)}$ x $1/\text{concentração de TRP (}\mu\text{M}^{-1}\text{)}$), no detalhe, gráfico de V_{max}^{-1} ($\text{nmol}^{-1}.\text{min}$) x concentração de inibidor (μM).

Os dados confirmam a existência de ação inibitória por parte de ambos os compostos analisados e revelam um K_i de 506 μ M para o DMT e de 156 μ M para a TRY. Também aqui foi observada superioridade da TRY em relação ao DMT no que diz respeito à influência sobre a atividade da enzima IDO. De acordo com os perfis de inibição apresentados, é possível afirmar que ambos pertencem à classe dos inibidores não-competitivos.

4.6 Inibição enzimática em sistema com células A172

De acordo com os resultados de inibição enzimática e cinética de inibição em sistemas sem células, DMT e TRY podem ser considerados inibidores da enzima IDO. A próxima etapa do trabalho pautou-se então na verificação dessa ação inibitória em sistema biológico utilizando células da linhagem de glioblastoma A172, que têm a característica de expressar IDO constitutivamente.

Inicialmente, foi avaliada a segurança da utilização do DMT e TRY na cultura celular. Para isso, foram feitos ensaios de citotoxicidade através da análise morfológica das células e análise da viabilidade celular pelos métodos de MTT e azul de tripan. De acordo com a figura 33, depois de 48 horas de estímulo, apenas a TRY na concentração de 500 μ M promoveu morte e alteração na morfologia celular, sendo os demais compostos considerados seguros nas concentrações avaliadas. O mesmo comportamento foi observado após 24 horas de incubação com os estímulos (dados não mostrados).

Figura 33: Análise da morfologia das células A172 na presença de 10µM, 50µM, 100µM e 500µM de DMT (A-D), TRY (E-H) e 1-MT (I-L). Abaixo, a viabilidade celular avaliada pelos métodos de MTT (M) e azul de tripan (N). Todos os experimentos foram realizados após 48 horas de incubação com os estímulos. (n=3; (***)p<0,001).

Diante das informações com relação à viabilidade celular na presença dos inibidores testados puderam-se determinar as concentrações ideais para os ensaios de inibição enzimática em células. Para o DMT foram avaliadas as concentrações de 100µM e 500µM, para TRY, 50µM e 100µM e para 1-MT, 50µM, 100µM e 500µM. De acordo com a figura 34, a ação inibitória do DMT e TRY sobre a enzima IDO, se

manteve tanto sobre a enzima constitutivamente expressa, quanto induzida por IFN- γ . Para ambos os compostos, houve aumento da ação inibitória diante do aumento da concentração, entretanto, as concentrações de 100 μ M de TRY, 500 μ M de DMT e 50 μ M de 1-MT apresentaram eficiência inibitória semelhantes.

Figura 34: Efeito de TRY, DMT e 1-MT sobre a atividade da enzima IDO expressa constitutivamente pelas células de glioblastoma A172, analisado através da dosagem de quinurenina extraída do sobrenadante da cultura celular após 24 horas de incubação com os estímulos. Ao controle foi adicionado apenas meio de cultura acrescido de 1% de DMSO. (n=3; (***)p<0,001; (*)p<0,05; (###)p<0,001 na comparação entre 1-MT 100 μ M e todos os demais grupos; (γγγ)p<0,001 na comparação entre 1-MT 500 μ M e todos os demais grupos).

5. Discussão

Neste trabalho verificamos a interação entre os compostos DMT e TRY com a enzima IDO tanto em ensaios enzimáticos em sistema livre de células como em ensaios na presença de células A172, que expressam IDO constitutivamente. Nossos resultados revelaram ações inibitórias para ambos os compostos, com K_i de 506 μ M para o DMT e de 156 μ M. Como estes valores de K_i são elevados quando comparados ao do 1-MT ($K_i = 35\mu$ M), quisemos avaliar se haveria a possibilidade de atuarem como inibidores endógenos. Para tanto, listamos alguns valores de K_i para inibidores endógenos de rotas bioquímicas comuns. Por exemplo, enzimas chave da via glicolítica como hexoquinase, fosfofrutoquinase e glicose-6-fosfato desidrogenase são inibidas endogenamente por ácidos graxo livres com K_i da ordem de milimolar [141]. Na própria via de degradação do TRP há os ácidos quinolínico e 3-hidroxiantranílico, conhecidos por atuarem como inibidores (competitivo e não-competitivo, respectivamente) da enzima monoamino oxidase B (MAO-B) com K_i de 1,4mM e 0,93mM [142]. Além desses, citamos a inibição da enzima adenosina desaminase, responsável pela conversão de adenosina em inosina, pela própria inosina com K_i de 300 μ M [143]. Assim sendo, concluímos que os valores de K_i obtidos para DMT e TRY em relação à IDO indicam que há a possibilidade de haver uma regulação endógena e, portanto, uma ação regulatória entre as vias das quinureninas e das triptaminas.

Nosso grupo, em trabalho anterior [133], já havia demonstrado uma regulação cruzada entre a via das quinureninas e a via serotoninérgica. Segundo Okada, S. S. [133], a N-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK), produto resultante da abertura do anel indólico da melatonina, inibiu de maneira competitiva a enzima IDO, com K_i de 980 μ M. Esse resultado, associado ao que foi descrito nessa dissertação, demonstra

interação direta entre as rotas de metabolismo do TRP, regulando a ação da principal enzima responsável pela via das quinureninas (Figura 35).

Figura 35: Esquema simplificado das interações existentes entre a via das triptaminas e serotonérgica sobre a via das quinureninas, ambas rotas de metabolismo do TRP. Em destaque, a regulação exercida pela TRY (vermelho) e DMT (azul) da via das triptaminas, demonstradas neste trabalho, e pelo AMK (verde) da via serotonérgica, demonstrada em estudo anterior do grupo [133].

DMT e TRY apresentaram perfis inibitórios característicos de inibidores não-competitivos clássicos, a exemplo do composto norharman e o 4-fenilimidazol [111],

descritos em 1989 e diversos outros compostos inibidores de IDO, como adocioquinona A e B, obtidos de invertebrados marinhos [115]. Conforme descrito por Röhrig, U. F. e colaboradores [123], a maioria dos inibidores eficientes de IDO apresenta perfis inibitórios compatíveis com inibidores dos tipos não-competitivos ou incompetitivos.

Durante muito tempo se arrastou uma discussão ao redor da possibilidade da TRY ser um substrato da enzima IDO [144,145]. Diante da ação inibitória apresentada por esse composto, e também por seu análogo dimetilado, essa hipótese foi avaliada nesse trabalho. Entretanto, de acordo com os dados obtidos, ficou comprovado que ambos DMT e TRY não atuam como substratos da IDO, e seus efeitos sobre a enzima se resumem à diminuição de sua atividade, atuando exclusivamente como inibidores enzimáticos.

As atividades inibitórias de ambos os compostos também foram observadas em sistema com células da linhagem de glioblastoma A172 sobre a IDO expressa constitutivamente, ou induzida por IFN- γ . Estes resultados são bastante relevantes, uma vez que diversos inibidores já estudados, com valores de K_i da ordem de nanomolar em experimentos sem células, mostraram-se ineficientes em sistemas com células [123]. Do ponto de vista farmacocinético, indicam que tanto DMT quanto TRY são capazes de atravessar a membrana celular a exercer suas atividades inibitórias, ao contrário do que foi observado para alguns potentes inibidores já descritos [118].

Associado a isso, resultados recentes do nosso grupo demonstraram que as células A172 expressam a enzima INMT, presente na via das triptaminas [130]. Esse fato sugere que esta linhagem celular é capaz de formar DMT a partir da TRY e que, conseqüentemente pode haver uma regulação cruzada entre a via das quinureninas

e a via das triptaminas nessas células. Esta regulação pode também estar presente em outras células e tecidos do organismo humano, como o pulmão, por exemplo, onde é descrita a expressão de IDO e transcritos de INMT [14,62].

Do ponto de vista farmacológico, o presente estudo traz como resultado a identificação de dois possíveis novos fármacos adjuvantes na imunoterapia anti-tumoral e sugere que ambos possam servir como precursores para a síntese de outros compostos com ação terapêutica. Diversos compostos sintéticos e naturais já foram identificados ao longo da história como eficientes inibidores da enzima IDO [108,112,115-117,145], com valores de K_i variando de $0,025\mu\text{M}$ a $5000\mu\text{M}$ (Tabela 2), entretanto, nenhum composto endógeno ainda tinha sido descrito.

Tabela 2: Nome e estrutura orgânica de alguns inibidores de IDO já descritos pela literatura, com seus respectivos tipos de inibição, K_i e solvente utilizado para os ensaios cinéticos. Destaque para os dados obtidos nesse estudo com relação ao DMT e à TRY.

Nome	Estrutura	Inibição	K_i	Solvente
1-MT		Competitiva	$35\mu\text{M}$	Tampão
Brassinina		Competitiva	$27,9\mu\text{M}$	DMSO
5-br-brassinina		Competitiva	$24,5\mu\text{M}$	DMSO
Adociaquinona B		Não-competitiva	$0,025\mu\text{M}$	MeOH

Adociaquinona A		Não-competitiva	0,086 μ M	MeOH
Annulin B		Não-competitiva	0,123 μ M	MeOH
Annulin C		Não-competitiva	0,144 μ M	MeOH
Naftoquinona		Não-competitiva	0,334 μ M	MeOH
Annulin A		Não-competitiva	0,694 μ M	MeOH
4-fenilimidazol		Não-competitiva	4,8 μ M	Tampão
2-mercapto-benzotiazol		Não-competitiva	7,4 μ M	Tampão
2-mercapto-feniltiazol		Não-competitiva	7,4 μ M	Tampão
Feniltiazol		Não-competitiva	8,9 μ M	Tampão
Warfarina		Não-competitiva	>32 μ M	MeOH
Norharman		Não-competitiva	176 μ M	Tampão

Cumarina		Não-competitiva	1110 μ M	MeOH
Dihidroquinona		Não-competitiva	>5000 μ M	MeOH
DMT		Não-competitiva	506μM	MeOH
TRY		Não-competitiva	156μM	DMSO

Fontes: Cady, S. G. (1991); Banerjee, T. (2007); Sono, M. (1989); Röhrig, U.F. (2010); Andersen, R. J. (Patente WO 2006/005185, 2006).

A utilização do DMT como adjuvante farmacológico na imunoterapia anti-tumoral pode trazer conseqüências ao sistema nervoso central, devido à sua ação alucinógena. Sabe-se que a dose oral limiar capaz de produzir efeitos subjetivos nos seres humanos é de 50 μ g de DMT/Kg de peso corporal [40,41], o que representa para uma pessoa de 70Kg, a ingestão de 3,5mg de DMT. A citotoxicidade é também um fator a ser considerado, especialmente para a TRY que apresentou uma grande toxicidade a partir da concentração de 500 μ M. DMT parece ser relativamente mais seguro, apresentando uma DL50 ao redor de 1,6mg/Kg de peso corporal quando administrado por via intravenosa e de 2mg/Kg quando administrado oralmente [146]. Nesse contexto, alterações estruturais nas moléculas de DMT e TRY parecem mais indicadas tendo em vista o uso para o tratamento farmacológico, atuando assim como protótipos para a síntese de novos compostos inibidores da enzima IDO.

Este estudo incentivou estudos paralelos do grupo que avaliaram a atividade inibitória do DMT e TRY em sistema de co-cultura da linhagem celular A172 com

células mononucleares periféricas humanas, além da análise da possível interferência destes compostos na expressão gênica da enzima. A discussão desses resultados encontra-se no trabalho que será enviado para publicação (em preparação).

6. Conclusões Finais

- I. O protocolo de síntese de DMT a partir da TRY mostrou ser eficiente, porém o de purificação poderá ser otimizado.
- II. DMT e TRY são inibidores do tipo não-competitivo de IDO, porém com valores de K_i superiores ao de 1-MT, um inibidor competitivo clássico.
- III. A inibição provocada por DMT e TRY pode ser observada inclusive sobre IDO expressa constitutivamente ou induzida por IFN- γ , em células de glioblastoma humano A172. Sendo assim, podem ser consideradas como moléculas modelo para a síntese de compostos com potencial farmacológico como adjuvantes no tratamento anti-tumoral.
- IV. O controle exercido pelos compostos da via das triptaminas sobre a via das quinureninas fornece base para o melhor entendimento da regulação do metabolismo do triptofano.

Referências

1. GAJEWSKI, T. F., MENG, Y., HARLIN, H. Immune Suppression in the Tumor Microenvironment. *J. Immunother.* 29 (3): 223-240. 2006.
2. LARSSON, M., HAGBERG, L., NORKRANS, G., FORSMAN, A. Indoleamine deficiency in blood and cerebrospinal fluid from patients with human immunodeficiency virus infection. *J. Neurosci. Res.* 23: 441-446. 1989.
3. FUCHS, D., MÖLLER, A. A., REIBNEGGER, G., STÖCKLE, E., WERNER, E. R., WACHTER, H. Decreased serum tryptophan in patients with HIV-1 infection correlates with increased serum neopterin and with neurologic/psychiatric symptoms. *J. Acquir. Immune Defic Syndr.* 3: 873-876. 1990.
4. MUNN, D. H. and MELLOR, A. L. (2007). Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance *J. Clin. Invest.* 117 (5): 1147-1154.
5. KATZ, J.B., MULLER, A.J., PRENDERGAST, G.C. (2008) Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immun. Rev.* 222: 206–221
6. WHITESIDE T.L. (2006). Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol.* 16:3-15.
7. RASTOGI, T., HILDESHEIM, A., SINHA, R. (2004). Opportunities of cancer epidemiology in developing countries. *Nat. Rev. Can.* 4. 909-917.
8. JACOB, M. S. and PRESTI, D. E. (2005). Endogenous psychoactive tryptamines reconsidered: an anxiolytic role for dimethyltryptamine. *Med Hypotheses.* 64: 930-37.
9. PETERS, J. C. (1991) Tryptophan nutrition and metabolism: an overview. *Adv. Exp. Med. Biol.* 294: 345–358.
10. GÁL, E. M., SHERMAN, A. D. (1980). L-kynurenine: its synthesis and possible function in brain. *Neurochem Res.* 5(3):223-39.
11. OXENKRUQ, G. F. (2010). Tryptophan kynurenine metabolism as a common mediator of genetic and environment impacts in major depressive disorder: the serotonin hypothesis revised 40 years later. *Isr. J. Psychiatry Relat. Sci.* 47(1):56-63.
12. MANDELL, A.J., MORGAN, M. (1971). Indole (ethyl)amine N-methyltransferase in human brain. *Nature* 230, 85-87.
13. BRUSCO, A. et al. (1994). Immunocytochemical localization of tryptamine in the rat-brain. *Neuroreport.* 5(5):597-600.
14. THOMPSON, M. A. et al. (1999). Human indolethylamine N-methyltransferase: cDNA cloning and expression, gene cloning, and chromosomal localization. *Genomics.* 61:285-97.

15. BEATON, J. M., CHRISTIAN, S. T. (1977). Stress induced changes in whole brain indolealkylamine levels in the rat: using gas liquid chromatography-mass spectrometry. *Abstr Soc Neurosci.* 4: 1322.
16. BOULTON, A.A. (1980). Trace amines and mental disorders. *Can. J. Neurol. Sci.* 7, 261–263.
17. DAVIS, B.A., BOULTON, A.A. (1994). The trace amines and their acidic metabolites in depression—an overview. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 18, 17–45.
18. FOGEL, W.A., ANDRZEJEWSKI, W., MASLINSKI, C. (1990). Neurotransmitters in hepatic encephalopathy. *Acta Exp. Neurobiol.* 50, 281–294.
19. CIPRIAN-OLLIVIER, J., CETKOVICH-BAKMAS, M.G. (1997). Altered consciousness states and endogenous psychosis: a common molecular pathway. *Schizo. Res.* 28, 257–265.
20. KIM, K.-A., VON ZASTROW, M. (2001). Old drugs learn new tricks: insights from mammalian trace amine receptors. *Mol. Pharmacol.* 60, 1165–1167.
21. FRANZEN, F.R, GROSS, H. (1965). Tryptamine, N,N-dimethyltryptamine, N,N-Dimethyl-5-hydroxytryptamine and 5-methoxytryptamine in human blood and urine. *Nature* 206. 1052.
22. BEATON, J.M, MORRIS, P.E. (1984). *MECH. Ageing Dev.* 25, 343.
23. LIPINSKI JF, MANDEL LR, AHN HS, VANDEN HEUVEL WJ, WALKER RW. (1974). Blood dimethyltryptamine concentrations in psychotic disorders. *Biol Psychiat* 1974;9:89–91.
24. OON, M.C., MURRAY, R.M., RODNIGHT, R., MURPHY, M.P., BIRLEY, J.L. (1977). Factors affecting the urinary excretion of endogenously formed dimethyltryptamine in normal human subjects. *Psychopharmacology (Berl)* 54:171–5.
25. BURCHETT SA, HICKS TP. (2006). The mysterious trace amines: protean neuromodulators of synaptic transmission in mammalian brain. *Prog Neurobiol.* 79:223-46.
26. KAPLAN, J., *et al.* (1974). Blood and urine levels of N,N-dimethyltryptamine following administration of psychoactive dosages to human subjects. *Psychopharmacologia.* 38 (3): 239-45.
27. SZARA, S. (1956). Dimethyltryptamine: its metabolism in man; the relation to its psychotic effect to the serotonin metabolism. *Experientia.* 12: 441-2.
28. HRYHORCZUK, L. M., RAINEY, JR., J. M., FROHMAN, C. E. AND NOVAK, E. A. (1986). A new metabolic pathway for N,N-dimethyltryptamine. *Biol Psychiatry.* 21: 84-93.

29. GOMES, M. M. *Dietilamida do ácido lisérgico (LSD) e N,N-dimethyltryptamina como substratos de peroxidases: uma possível rota de metabolização*. (2008). 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP.
30. MCLLHENNY, E. H., *et al.* (2010). Methodology for and the determination of the major constituents and metabolites of the Amazonian botanical medicine ayahuasca in human urine. *Biomedical Chromatography* 25:970-984.
31. BOROWSKY, B., *et al.* (2001). Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 8966–8971.
32. LINDEMANN L, *et al.* (2005). Trace amine-associated receptors form structurally and functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors. *Genomics* 85: 372–385
33. BUNZOW, J.R., *et al.* (2001). Amphetamine, 3,4- methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor. *Mol. Pharmacol.* 60, 1181–1188.
34. CIKOS, S., GREGOR, P., KOPPEL, J. (2001). Cloning of a novel biogenic amine receptor-like G protein-coupled receptor expressed in human brain. *Biochim. Biophys. Acta* 1521, 66–72.
35. FONTANILLA, D., *et al.* (2009). The allucinogen N,N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator. *Science* 323. 934-937.
36. WINTER, J. C. (2009). Hallucinogens as discriminative stimuli in animals: LSD, phenethylamines, and tryptamines. *Psychopharmacology*. 203:251-263.
37. SMITH, R. L., *et al.* (1998). Agonist proprieties os N,N-dimethyltryptamines at serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Pharmacology Biochemistry and behavior*. 61(3):323-330.
38. SCHULTES, R.E., HOFMANN, A. (1987). Plants of the gods: origins of hallucinogenic use. A. *Van der Marck Editions, New York*.
39. RIBA, J. ROMERO, S., GRASA, E., MENA, E., CARRIÓ, I., BARBANOJ, M.J. (2006). Increased frontal and paralimbic activation following ayahuasca, the pan-amazonian inebriant. *Psycopharmacology*. 186: 93-98.
40. STRASSMAN, R.J., QUALLS, C.R. (1994). Dose-response study of N,N-dimethyltryptamine in humans. I. Neuroendocrine, autonomic, and cardiovascular effects. *Arch Gen Psychiat.* 51:85-97.
41. STRASSMAN, R.J. (1996). Human psychopharmacology of N,N-dimethyltryptamine. *Behav Bain Res.* 73:121-4.
42. JULIEN, R.M. (1998). *A primer of drug action*. Eighth edition, Feeman.

43. MCKENNA, D.J., CALLAWAY, J.C., GROB, C.S. (1998). The scientific investigation of ayahuasca: a review of past and current research. *The Heffer Review of Psychedelic Research*. Volume 1.
44. HIGUCHI, K. AND HAYAISHI, O. (1967). Enzymic formation of D-kynurenin from D-tryptophan. *Arch. Biochem. Biophys.* 120: 397-403.
45. SUGIMOTO, H., ODA, S., *et al.* (2006). Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: Catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Biophysics*. 21, 103 (8): 2611–2616
46. AREFAYENE M, *et al.* Identification of functional genetic variants of the indoleamine 2,3 dioxygenase gene. *American Association for Cancer Research 97th Annual Meeting Proceedings*; 2006 Apr 1–5, Washington, DC: 1119.
47. HAYAISHI, O., ROTHBERG, S., MEHLER, A. H., SAITO, Y. (1957) Studies on oxygenases: enzymatic formation of kynurenine from tryptophan. *J. Biol. Chem.* 229: 889–896. 1957.
48. METZ, R., *et al.* (2007). Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the anti-tumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Res.* 67: 7082–7087. 2007.
49. TARENTIS, A. C., *et al.* (2002). The heme environment of recombinant human indoleamine 2, 3 dioxygenase. Structural properties and substrate-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* 277 (18): 15788-15794. 2002.
50. GIANI, D. A., CASTAGNOLI, R. P., *et al.* (1996). Regulation of the Kynurenine Metabolic Pathway by Interferon- γ in Murine Cloned Macrophages and Microglial Cells. *J Neurochemistry*. 66(3): 996-1004.
51. FERRY, G., *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.
52. SONO, M., TANIGUCHI, T., WATANABE, Y., HAYAISHI, O. Indoleamine 2, 3 dioxygenase. Equilibrium studies of the tryptophan binding to the ferric, ferrous and CO-bound enzymes. *J. Biol. Chem.* 255: 1339-1345. 1980.
53. OHNISHI, T., HIRATA, F., *et al.* (1977). Indoleamine 2,3 dioxygenase. Potassium superoxide as substrate. *J. Biol. Chem.* 252: 4643-4647.
54. SONO, M. (1989). The roles of superoxide anion and methylene blue in the reductive activation of indoleamine 2,3 dioxygenase by ascorbic acid or by xanthine oxidase-hypoxanthine. *J. Biol. Chem.* 264: 1616-1622.

55. TAKIKAWA, O. (2005) Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338: 12–19.
56. SEDLMAYR, P., BLASCHITZ, A., *et al.* (2002). Localization of indoleamine 2,3-dioxygenase in human female reproductive organs and the placenta. *Mol Hum Reprod.* 8(4):385-391
57. TAKIKAWA, O., YOSHIDA, R., HAYAISHI, O. Monooxygenase activities of dioxygenases. Benzphetamine demethylation and aniline hydroxylation reactions catalyzed by indoleamine 2, 3-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 258: 6808–6815. 1983.
58. POLJAK, A., *et al.* (2006) Inhibition of indoleamine 2, 3 dioxygenase activity by H₂O₂. *Arch. Biochem. Biophys.* 450: 9-19.
59. THOMAS, S. R., STOCKER, R. (1999). Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *Redox Report.* 4(5): 199-220.
60. MELLOR, A. (2005) Indoleamine 2,3 dioxygenase and regulation of T cell immunity *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 338 20–24
61. ROY, E. J., TAKIKAWA, O., *et al.* (2005). Neuronal localization of indoleamine 2,3-dioxygenase in mice. *Neurosci Lett.* 21;387(2):95-99.
62. HAYASHI, T., BECK, L., *et al.* (2004). Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest.* 114(2):270-279.
63. TAYLOR, M.W., FENG, G. (1991) Relationship between interferon- γ , indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism, *FASEB J.* 5:2516-2522.
64. MUNN, D. H., SHARMA, M. D., *et al.* (2002). Potential regulatory function of human dendritic cells expressing Indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science.* 297: 1867-1870.
65. MELLOR A.L., MUNN D.H. (2004) IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol.* 4:762-74.
66. MUNN D. H., SHARMA M. D., HOU D., *et al.* (2004) Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *JClinInvest.* 114:280-90.
67. UYTENHOVE, C., *et al.* (2003). Evidence for tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3 dioxygenase. *Nat. Med.* 9 (10): 1269-1274.
68. YOSHIDA, R., IMANISHI, J., OKU, T., KISHIDA, T., AND HAYASHI, O. (1981) Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon *Proc. Nat Acad. Sci. USA* 78 (1): 129-132

69. SCHRODER, K., HERTZOG, P. J. RAVASI, T., and HUME, D. A. (2004). Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75: 163-189.
70. GROHMANN, U., FALLARINO, F., PUC CETTI, P. (2003). Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends in Immunology*. 24(5): 242-248.
71. OZAKI, Y., EDELSTEIN, M.P., DUCH, D.S. (2008). Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase: a mechanism of the anti-tumor activity of interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85:1242–1246.
72. FRUMENTO G, ROTONDO R, TONETTI M, DAMONTE G, BENATTI U, FERRARA G.B. (2002). Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med*. 196:459-68.
73. BOYLAND, E., WILLIAMS, D.C. (1955). The estimation of tryptophan metabolites in the urine of patients with cancer of the bladder. *Process Biochem*;60:v.
74. AMBANELLI, U., RUBINO, A. (1962). Some aspects of tryptophan–nicotinic acid chain in Hodgkin's disease. Relative roles of tryptophan loading and vitamin supplementation on urinary excretion of metabolites. *Haematol Lat*. 5:49–73.
75. WOLF, H., MADSEN, P.O., PRICE, J.M. (1968). Studies on the metabolism of tryptophan in patients with benign prostatic hypertrophy or cancer of the prostate. *J Urol*, 100:537–543
76. MUNN, D. H., ZHOU, J. T, *et al.* (1998). Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*, 281: 1191-1193.
77. MELLOR, A. L., SIVAKUMAR, J., CHANDLER, P., *et al.* (2001). Prevention of T-cell driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. *Nat. Immunol*, 2: 64-68.
78. MELLOR, A. L., BABAN, B., *et al.* (2003). Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J Immunol*. 15;171(4):1652-1655.
79. MELLOR, A. L. and MUNN, D. H. (1999). Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation. *Immunol. Today*. 20 (10): 469-473.
80. MULLER A. J., MALACHOWSKI, W. P., *et al.* (2005). Indoleamine 2,3 dioxygenase in cancer: targeting pathological immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Expert. Opin Ther. Targets*. 9: 831-849.
81. ISHIO, T., GOTO, S., TAHARA, K., TONE, S., KAWANO, K., KITANO, S. Immunoactivative role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in human hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol*. 19: 319–326. 2004.
82. BALL, H. J., SANCHEZ-PEREZ, A., WEISER, S., AUSTIN, C. J., ASTELBAUSER, F., MIU, J., MCQUILLAN, J. A., STOCKER, R., JERMIIN, L. S., HUNT, N. H.

- Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene*. 396: 203–213. 2007.
83. MURRAY, M. F. The human indoleamine 2, 3-dioxygenase gene and related human genes. *Curr. Drug. Metab.* 8: 197–200. 2007.
 84. METZ, R., DUHADAWAY, J. B., KAMASANI, U., LAURY-KLEINTOP, L., MULLER, A. J., PRENDERGAST, G. C. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the anti-tumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Res.* 67: 7082–7087. 2007.
 85. HANSEN, A. M., BALL, H. J., MITCHELL, A. J., MIU, J., TAKIKAWA, O., HUNT, N. H. Increased expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase in murine malaria infection is predominantly localized to the vascular endothelium. *Int. J. Parasitol.* 34 (12): 1309–1319. 2004.
 86. TAKIKAWA, O., KUROIWA, T., YAMAZAKI, F., KIDO, R. Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2, 3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anti cellular activity. *J. Biol.Chem.* 263: 2041–2048. 1988.
 87. GATTI R.A., GOOD R.A. (1971). Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* . 28: 89–98.
 88. GUTIERREZ-DALMAU A, CAMPISTOL JM. (2007). Immunosuppressive therapy and malignancy in organ transplant recipients: a systematic review. *Drugs*. 67:1167–1198.
 89. SWANN, J. B.; SMYTH, M. (2007). Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest.* 117(5):1137-1146
 90. MUNN, D. H., SHAFIZADEH, E., ATTWOOD, J. T., BONDAREV, I., PASHINE, A., MELLOR, A. L. (1999). Inhibition of T-cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J. Exp. Med.* 189:1363-1372.
 91. INO, K.; YAMAMOTO, E.; SHIBATA, K.; KAJIYAMA, H.; YOSHIDA, N.; TERAUCHI, M.; NAWA, A.; NAGASAKA, T.; TAKIKAWA, O.; KIKKAWA, F. (2008). Inverse correlation between tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with disease progression and survival. *Clin Cancer Res*, 14:2310-2317.
 92. DELLA CHIESA M, CARLOMAGNO S, FRUMENTO G, et al. (2006) The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood*. 108:4118 - 25.
 93. POPOV, A., SCHULTZE, J. L. IDO-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection. *J. Mol. Med.* 86: 145–160. 2008.

94. CONDEELIS, J., POLLARD, J. W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 124: 263-266. 2006.
95. YEH, K., SILBERMAN, D., GONZALEZ, D., RIGGS, J. Complementary suppression of T cell activation by peritoneal macrophages and CTLA-4-Ig. *Immunol*. 212: 1-10. 2007.
96. FALLARINO, F., *et al.* (2006). The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites downregulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J. Immunol*. 176 (11): 6752–61.
97. CHEN, W., LIANG, X., PETERSON, A. J., MUNN, D. H., BLAZAR, B. R. (2008). The indoleamine 2,3 dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptative T cell regulatory cell generation. *J. Immunol*. 181: 5396-5404.
98. KRONENBERG M., RUDENSKY A. (2005). Regulation of immunity by selfreactive T cells, *Nature*. 435 (7042):598-604.
99. ALVARO, T., *et al.* (2005). Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin. Cancer Res*. 11: 1467–1473.
100. PAN, K., WANG, H., CHEN, M., ZHANG, H., WENG, D., ZHOU, J., HUANG, W., LI, J., SONG, H., XIA, J. (2008). Expression and prognosis role of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocellular carcinoma *J Cancer Res Clin Oncol*. 134(11):1247-1253
101. 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.
102. INO K, YOSHIDA N, KAJIYAMA H, *et al.* (2006) Indoleamine 2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer. *BrJCancer*. 95:1555-61.
103. OKAMOTO A, NIKAIDO T, OCHIAI K, *et al.* (2005). Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res*. 11:6030- 9.
104. ASTIGIANO S, MORANDI B, COSTA R, *et al.* (2005) Eosinophil granulocytes account for indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated immune escape in human non-small cell lung cancer. *Neoplasia*. 7:390-6.
105. BRANDACHER G., PERATHONER A., LADURNER R., *et al.* (2006) Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Res* 12:1144-51.
106. MAZZOLINI, G., *et al.* (2007) Immunotherapy and immunoescape in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 13(44): 5822-5831

107. MULLER, A. J.; SCHERLE, P. A. (2006). Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 6:613-625.
108. FRIBERG, M., *et al.* (2002). Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *Int J Cancer*, 101:151–155.
109. HOU, D.Y., *et al.* (2007). Inhibition of IDO in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with anti-tumor responses. *Cancer Res.* **67**:792–801.
110. SONO, M. (1989). Enzyme kinetic and spectroscopic studies of inhibitor and effector interactions with indoleamine 2,3-dioxygenase. 2. Evidence for the existence of another binding site in the enzyme for indole derivative effectors. *Biochemistry*, 28:5400–5407.
111. SONO, M., CADY, S. G. (1989). Enzyme kinetic and spectroscopy studies of inhibitor and effector interactions with indoleamine 2,3-dioxygenase. 1. Norharman and 4-phenylimidazole binding to the enzyme as inhibitors and heme ligands. *Biochemistry*. 28:5392-5399.
112. CADY, S. G., SONO, M. 1-methyl-DL-tryptophan, β -(3-benzofuranyl)-DL-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and β -[3-benzo(b)thienyl]-DL-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indoleamine 2,3 dioxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 291 (2): 326-333. 1991.
113. SONO, M. *et al.* (1996). Heme-containing oxygenases. *Chem. Rev.* 96:2841-2888.
114. MULLER, A. J. *et al.* (2005). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin 1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med.* 11:312-319.
115. ANDERSEN, R. *et al.* (2006). Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibitors. Patent WO 2006/005185.
116. BRASTIANOS, H. C., *et al.* (2006). Exiguamine A, an indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibitor isolated from the marine sponge *Neopetrosia exigua*. *J. Am. Chem. Soc.* 128:16046:16047.
117. PEREIRA, A., VOTTERO, E., ROBERGE, M., A. MAUK, G., ANDERSEN, R. J. Indoleamine 2,3-Dioxygenase inhibitors from the northeastern Pacific marine hydroid *Garveia annulata*. *J. Nat. Prod.* 69: 1496-1499. 2006.
118. VOTTERO, E. *et al.* (2006). Inhibitors of human indoleamine 2,3-dioxygenase identified with a target-based screen in yeast. *Biotechnol. J.* 1:282-288.
119. GASPARI, P., *et al.* (2006). Structure-activity study of brassinin derivatives as indoleamine 2,3- dioxygenase inhibitors. *J Med Chem*, 49:684–692.

120. BANERJEE, T., *et al.* (2007). A key in vivo antitumor mechanism of action of natural productbased brassinins is inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Oncogene advance online publication*; (DOI 10.1038/sj.onc.1210939).
121. PARK, E.J., PEZZUTO, J.M. (2002). Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev*, 21:231–255.
122. MEHTA, R.G., *et al.* (1995). Cancer chemopreventive activity of brassinin, a phytoalexin from cabbage. *Carcinogenesis*, 16:399–404.
123. RÖHRIG, U. F., *et al.* (2010). Rational design of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors. *J. Med. Chem.* 53:1172-1189.
124. SAYAMA, S., YOSHIDA, R., OKU, T., IMANISHI, J., KISHIDA, T., HAYAISHI, O. (1981). Inhibition of interferon- mediated induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in mouse lung by inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78:7327–7330.
125. ALBERATI-GIANI, D., MALHERBE, P., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., KOHLER, C., DENIS-DONINI, S., CESURA, A.M. (1997). Differential regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase expression by nitric oxide and inflammatory mediators in IFN-gamma-activated murine macrophages and microglial cells. *J Immunol*, 159:419–426.
126. DAUBENER, W., POSDZIECH, V., HADDING, U., MACKENZIE, C.R. (1999). Inducible anti-parasitic effector mechanisms in human uroepithelial cells: tryptophan degradation vs. NO production. *Med Microbiol Immunol (Berlin)* 187:143–147.
127. THOMAS, S.R., MOHR, D., STOCKER, R. (1994). Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes. *J Biol Chem*, 269:14457–14464.
128. HUCKE, C., MACKENZIE, C.R., ADJOGBLE, K.D., TAKIKAWA, O., DAUBENER, W. (2004). Nitric oxidemediated regulation of gamma interferoninduced bacteriostasis: inhibition and degradation of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immunol*, 72:2723–2730.
129. JEMAL, A. *et al.* (2006). Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin.* 56(2):106-30.
130. COIMBRA, J. B. Dissertação de mestrado em Ciência Farmacêuticas em andamento. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP.
131. BOSH, J, *et al.* (2001). Synthesis of 5-(sulfamoylmethyl)índoles. *Tatrahedron*. 57:1041-1048.

132. LITTLEJOHN, T.K., TAKIKAWA, O., SKYLAS, D., JAMIE, J.F., WALKER, M.J., TRUSCOTT R.J.W. Expression and Purification of Recombinant Human Indoleamine 2, 3-Dioxygenase. *Prot. Exp. Pur.* 19: 22–29. 2000.
133. OKADA, S.S.. *Regulação cruzada entre peroxidases e indolamine 2,3-dioxigenase no controle da metabolização do triptofano.* (2010). 165f. Tese (Doutorado Direto em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP.
134. YAMAMOTO, S. And HAYASHI, O. (1967). Tryptophan pyrrolase of rabbit intestine. D- and L-tryptophan-cleaving enzyme or enzymes. *J. Biol. Chem.* 242: 5260-5266
135. SEGEL I H. Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-stateenzyme systems. New York: Wiley-Interscience, 1975. 957 *Department of Biochemistry and Biophysics, University of California, Davis, C*
136. KNEBEL, F. H. Ação da amilóide sérica A em linhagens celulares de glioma humano. (2010). 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP.
137. FERREIRA, D.F. (2003). Análises estatísticas por meio do SISVAR (Sistema para análise de variância) para Windows versão 5.1. DEX/UFLA.
138. SHIMIZU, T., NOMIYAMA S., HIRATA, F., HAYAISHI, O. Indoleamine 2, 3 dioxigenase: purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 253 (13): 4700-4706. 1978.
139. MAGHZAL, G. J., Thomas, S.R., Hunt, N.H. and Stocker, R. (2008). Cytochrome b5, not superoxide anion radical, is a major reductant of indoleamine 2,3 dioxigenase in human cells. *JBC.* 283 (18): 12014-12025.
140. PETERSON, A. C., *et al.* (1994). Evaluation of functionalized tryptophan derivatives and related compounds as competitive inhibitors of indoleamine 2, 3 dioxigenase. *Med. Chem. Res.* 3: 531–544.
141. WEBER, G., *et al.* (1966). Feedback inhibition of key glycolytic enzymes in liver: action of free fatty acids. *Science.* 154:1357-1360.
142. NAOI, M. *et al.* (1987). Quinolinic acid: an endogenous inhibitor specific for type B monoamine oxidase in human brain synaptosomes. *Neuroscience letters.* 74:232-236.
143. VOET, D., VOET, J. G. and PRATT, C. W., *Fundamentals of Biochemistry.* (3rd ed.) John Wiley & Sons, 2008.
144. STONE, T. W. and DARLINGTON, L. G. (2002). Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nature Reviews.* 1:609-620.

145. KUDO, Y., BOYD, C. A. R. Human placental indoleamine 2,3 dioxygenase: cellular localization and characterization of an enzyme preventing fetal rejection. *Biochim Biophys Acta*. 1500: 119-124. 2000.
146. PIRES, A. P. S., OLIVEIRA, C. D. R. and YONAMINE, M. (2010). Ayahuasca: uma revisão dos aspectos farmacológicos e toxicológicos. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 31(1):15-23.

Anexos

ANEXO A - Histórico escolar da Pós-Graduação (Sistema Janus)

HISTÓRICO JANUS

ANEXO B – Curriculum vitae (Plataforma Lattes)

Dados Pessoais

Nome: Melissa Cavalheiro Tourino

Nome em citações bibliográficas: TOURINO, M. C.

Endereço profissional: Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Av. Prof. Lineu Prestes, 581 - Bloco 17 – Superior, São Paulo
05588-000, SP - Brasil
Telefone: 11 30913741

Endereço eletrônico: e-mail para contato : melissatourino@usp.br
e-mail alternativo : melissa_farmaefoa@yahoo.com.br

Formação Acadêmica/Titulação

2010 - atual	Mestrado em Ciências Farmacêuticas.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Estudo da ação inibitória da enzima indolamina 2,3-dioxigenase por compostos indólicos e seus produtos de oxidação
Orientador: Ana Campa
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
2007 - 2008	Aperfeiçoamento em VIII Curso de Aperfeiçoamento em Análises Clínicas.
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
Título: Não exigida.
2003 - 2006	Graduação em Farmácia Bioquímica.
Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil

Formação complementar

2009 - 2009	Substâncias Vasoativas.
Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2009 - 2009	Planejamento e Análise de Experimentos.
Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2006 - 2007	Estágio de Interesse Curricular Análises Clínicas.
Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2006 - 2006	Extensão universitária em Absorção Atômica.
Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2006 - 2006	Extensão universitária em Mesa Redonda: Formação do Profissional Generalista.
Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2006 - 2006	Curso de curta duração em Curso Teórico-Prático de Primeiros Socorros.
Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Belo Horizonte, Brasil

2006 - 2006	Extensão universitária em Mesa Redonda:Atuações do Profissional Farmacêutico. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2006 - 2006	Extensão universitária em Cosméticos Restauradores e Preventivos. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2006 - 2006	Extensão universitária em Introdução à Indústria Cosmética. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2006 - 2006	Extensão universitária em Legislação/Acreditação Aplicada a Lab Clínicos. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2006 - 2006	Extensão universitária em Hipnose: Mitos e Verdades. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2006 - 2006	Extensão universitária em Emprego de Polímeros Impressos Molecularmente. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2006 - 2006	Extensão universitária em Mesa Redonda: Unifal, Universidade de fato?. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2006 - 2006	Extensão universitária em Acidentes por Serpentes: Prevenção, Diagn e Tratam. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2005 - 2006	Estágio Voluntário Laboratório de Microbiologia. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2005 - 2005	Extensão universitária em Desafios Atuais do Ensino-Aprendizagem. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em Aplicação de Injeções. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em Garantia e Controle Qualidade- Laboratório Clínico. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em Modelagem Molecular no Planejamento de Fármacos. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2005 - 2005	Estágio não obrig. em Farmácia Ambulatorial do SUS. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Montagem de Farmácia Magistral. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Avaliação Bioquímica da Função Renal Interpretação. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Fitoterapia e uso Clínico de Fitoestrogenos. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2004 - 2004	Extensão universitária em Câncer A Humanidade Contra Ataca Grupo Pet de Farm. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2004 - 2004	Extensão Universitária em Orientação Farmacêutica - Farmácia Igreja SJ e Dores. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Implementação Política de Gerenciamento de Resíduos.

	Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Nutrição e Esporte: Uma Abordagem Bioquímica. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2003 - 2003	Extensão universitária em Mesa Redonda: O Ato Médico. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2003 - 2003	Extensão universitária em Risoterapia Grupo Pet Enfermagem. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
2003 - 2003	Curso de curta duração em Bioquímica do Câncer. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2010 - Atual	Vínculo: Pós-graduanda , Enquadramento funcional: Mestranda , Carga horária: 40, Regime: Dedicação Exclusiva
2011 - 2011	Vínculo: Pós-Graduanda , Enquadramento funcional: Monitor - Prog. Aperfeiçoamento Ensino - PAE , Carga horária: 8, Regime: Dedicação Exclusiva
2010 - 2010	Vínculo: Pós-Graduanda , Enquadramento funcional: Monitor - Prog. Aperfeiçoamento Ensino - PAE , Carga horária: 6, Regime: Dedicação Exclusiva
2010 - 2010	Vínculo: Pós-Graduanda , Enquadramento funcional: Monitor - Prog. Aperfeiçoamento Ensino - PAE , Carga horária: 8, Regime: Dedicação Exclusiva

Atividades

2010 - 2012	Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas <i>Participação em projetos: Estudo da ação inibitória da enzima indolamina 2,3-dioxigenase por compostos indólicos de seus produtos de oxidação</i>
--------------------	---

2. Laboratório Santa Cecília - LSC

Vínculo institucional

2007 - 2009	Vínculo: Celetista formal , Enquadramento funcional: Farmacêutica Bioquímica , Carga horária: 60, Regime: Integral
--------------------	---

3. Drogaria e Perfumaria Center de Piedade - DPCP

Vínculo institucional

2007 - 2008 Vínculo: Celetista formal , Enquadramento funcional: Farmacêutica , Carga horária: 12, Regime: Parcial

4. Laboratório Santa Mônica - LSM

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: Celetista formal , Enquadramento funcional: Farmacêutica Bioquímica , Carga horária: 48, Regime: Integral

5. Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL/MG

Vínculo institucional

2003 - 2006 Vínculo: Graduanda , Enquadramento funcional: Estudante , Carga horária: 40, Regime: Dedicação Exclusiva

Projetos

2010 - Atual Estudo da ação inibitória da enzima indolamina 2,3-dioxigenase pelos compostos triptamina (TRY) e N,N-dimetiltriptamina (DMT)

Descrição: A enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) é responsável pelo metabolismo do aminoácido essencial triptofano pela via das quinureninas. Sua expressão em células tumorais está relacionada ao mecanismo de imune escape apresentado por essas células. Desta forma, a inibição da IDO tem sido considerada uma importante estratégia terapêutica.

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Melissa Cavalheiro Tourino (Responsável); ; Ana Campa

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, CAPES - Centro Anhanguera de Promoção e Educação Social-CAPEs, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

Áreas de atuação

1. ANÁLISES CLÍNICAS

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Razoavelmente, Escreve Bem, Lê Bem

Espanhol Compreende Razoavelmente , Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Bem

Prêmios e títulos

- 2011** Menção Honrosa, XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE
- 2011** Travel Award, Free Radicals 2011 - VII Meeting of South American Group of SFRMB

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. TOURINO, M. C., OKADA, S.S., Dörr, F.A., CAMPA, A.
Inhibition of Indoleamine 2,3-dioxygenase by two triptamines In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2011
FeSBE. , 2011.
2. TOURINO, M. C., OKADA, S.S., Dörr, F.A., CAMPA, A.
Tryptamine and N,N-dimethyltryptamine as indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors In: Free Radicals - I São Paulo Advanced School (ESPCA) on Redox Processes in Biomedicine and VII Meeting of the SFRBM South American Group, 2011
Free Radicals - VII Meeting of the SFRBM South American Group. , 2011.

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE**, 2011. (Congresso)
Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase by two triptamines.
2. Apresentação Oral no(a) **III Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciência Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**, 2011. (Simpósio)
Metabolismo do triptofano em células tumorais e do sistema imune.
3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Free Radicals - I São Paulo Advanced School and VII Meeting of SFRBM South American Group**, 2011. (Congresso)
Tryptamine and N,N-dimethyltryptamine as indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors.
4. **10o. Congresso de Farmácia e Bioquímica de Minas Gerais - CRFMG**, 2009. (Congresso)
.
5. **Mês Acadêmico - Unifal**, 2006. (Congresso)
.
6. **1a. Semana da Química - Unifal**, 2005. (Congresso)
.

7. **XL Semana Farmacêutica - Unifal**, 2005. (Congresso)

.

8. **39a. Semana Farmacêutica da Efoa/Ceufe**, 2004. (Congresso)

.

9. Apresentação de Poster / Painel no(a) **II Mostra do Conhecimento: Graduação, Pesquisa e Extensão**, 2003. (Congresso)

Atenção Farmacêutica no Grupo de Assistência e Alfabetização (GRAAL) - II Mostra do Conhecimento: Graduação, Pesquisa e Extensão.

10. **9a. Jornada de Iniciação Científica de Alfenas**, 2003. (Encontro)

.

11. **38a. Semana Farmacêutica da Efoa/Ceufe**, 2003. (Congresso)