UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Efeitos dos inibidores de IDO e TDO na proliferação, migração e invasão de melanomas humanos e na atividade tumoricida de células mononucleares.

Maryana Stephany Ferreira Branquinho

Orientador: Prof. Tit. Ana Campa

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Efeitos dos inibidores de IDO e TDO na proliferação, migração e invasão de melanomas humanos e na atividade tumoricida de células mononucleares.

Maryana Stephany Ferreira Branquinho

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Tit. Ana Campa

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica

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

B821e Branquinho, Maryana Stephany Ferreira
Efeitos dos inibidores de IDO e TDO na proliferação, migração e
invasão de melanomas humanos e na atividade tumoricida de células
mononucleares / Maryana Stephany Ferreira Branquinho. -- São
Paulo, 2015.
95p.

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. Câncer : Imunologia I. T.
II. Campa, Ana, orientador.

616.0756 CDD

Maryana Stephany Ferreira Branquinho

Efeitos dos inibidores de IDO e TDO na proliferação, migração e invasão de melanomas humanos e na atividade tumoricida de células mononucleares.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre.

Profa. Tit. Ana Campa
Orientadora/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2015.

**Dedico este trabalho a Deus, fonte inesgotável
de força em todos os momentos desta
caminhada.**

**Aos meus pais, Sivaldo e Suelene. Obrigada por
acreditarem e incentivarem esta conquista.**

**À Ana Campa, orientadora, e definição melhor
não há. Obrigada por abrir os meus olhos para
a ciência.**

“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê...”

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus! Obrigada por tornar possível esta vitória!

“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida no livro do tempo. Aquilo que colocamos nela corre por nossa conta”.

Chico Xavier

Mãe e Pai: Obrigada! Não existem palavras que eu invente para escrever aqui capazes de expressar a minha gratidão. Talvez a maneira na qual eu irei olhar pra vocês no final da minha aula no dia da defesa, traduza este sentimento. Nada disso aconteceria se vocês não tivessem dito “ok, pode deixar tudo aqui com a gente, pode ir para SP.”. Obrigada por serem os melhores pais e os melhores amigos. Vocês são os melhores do mundo! Guilherme, obrigada por sempre ter sido o meu maior parça e o melhor irmão que alguém pode ter! Espero que você me ajude a fazer na comemoração da defesa, metade do que fizemos na da qualificação. Só metade porque não há necessidade de apelação dessa vez, hehehe. Madrinha, obrigada por estar sempre aqui com a gente, sem a senhora a vida não teria o mesmo sentido. E obrigada também pela oncinha que eu ganhava a cada ida à Alfenas, ela salvava todo final de mês (e vai continuar salvando no doutorado). Vocês quatro são a melhor família para a qual Deus poderia ter me mandado. EU AMO VCS!

Chefa, obrigada pela paciência, dedicação e confiança durante esses três anos. Ahhh, e obrigada também pelo abraço com o qual você me recebeu quando vim conhecer o Lab. Ele fez toda a diferença no momento de resolver se era isso mesmo que eu queria.

Ao pessoal do Lab: Ale, Ari, Carol, Edson, Fran, Janis, Luzi, Mari, Maysa, Michele, Nathi, Renan, Sika e Thais eu só tenho a agradecer por tudo o que eu aprendi nesse tempo em que estive com vocês. Espero conseguir passar a diante todos os ensinamentos que adquiri enquanto vocês todos ainda estavam por aqui. Grupo W, obrigada por estarem sempre me ensinando e dando puxões de orelha. Este trabalho é nosso, porque somos e sabemos o que é ser um GRUPO.

Luciene, Marcela e Juliana, vocês foram as pessoas certas no lugar certo. Durante muito tempo eu ainda irei agradecer a Deus por ter colocado vocês na minha vida. Vocês são minha segunda família.

Débora, Nayara, Paula, Samara e Cássia, obrigada pela amizade de alguns 20 e poucos anos. Vocês estiveram e estarão presentes nos momentos mais importantes da minha vida.

Maylla, Ana, Jacque (minhas três filhinhas), Simoninha e Tai obrigada pela amizade, companhia, caronas, cervejas, conversas, conselhos. Obrigada por estarem sempre presentes nos bons e nos maus momentos. Bora comemorar sajoçaaaaa...

Brendinha e Tili, obrigada pela presença e amizade em TODOS os momentos. Obrigada por terem vindo à São Paulo 7628710191 vezes, enquanto eu tive o trabalho de me deslocar 0 vezes até a casa de vocês em todo este tempo! Minha cara nem queima mesmo!! Loviu!

Paulo, Deus não poderia ter te colocado na minha vida em outro momento. Obrigada por me incentivar, acreditar e entender esse período estressante de fim de mestrado.

Não posso me esquecer de agradecer também àqueles que mesmo de longe, sempre ajudaram de alguma maneira, primos, tios, tias e avós. Obrigada pelo carinho...

Agradeço ainda à todos os professores colaboradores que tornaram possível a realização deste trabalho. Especialmente o Prof. Ernani, pela disponibilidade do massas e da Ari, Prof^{as} Silvy, Silvia e Dulcinéia pelo empréstimo de aparelhos e reagentes. Aos colegas de departamento, amigos da Hemato, Pato e Bioquímica. Às meninas da secretaria que sempre me salvaram nos momentos de desespero! À Claudinha e a Rose, que nos mantém acordados com o bom cafezinho de todo dia. À Renatinha, pelos inúmeros “socorros” que pedi e sempre fui atendida.

Agradeço também ao CNPq e a Capes pelo financiamento desta pesquisa.

“É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas.”

O Pequeno Príncipe

RESUMO

BRANQUINHO, M.S.F. **Efeitos dos inibidores de IDO e TDO na proliferação, migração e invasão de melanomas humanos e na atividade tumorícida de células mononucleares.** 2015. 95f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

No câncer, o aumento da expressão das enzimas indolamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO1) e triptofano 2,3-dioxigenase (TDO), que convertem o triptofano (Trp) em quinurenina (QUIN), tem sido associado ao mecanismo de imuno escape tumoral e inibidores destas enzimas têm sido considerados como imunoadjuvantes na terapia antitumoral. O mais conhecido deles é o 1-metil-triptofano (1-MT), um inibidor competitivo da IDO e alvo de estudos clínicos. O 1-MT é encontrado nas formas enantioméricas *D*- e *L*- e embora o enantiômero 1-*L*-MT seja mais eficiente na inibição da IDO1 (a isoforma mais ativa em tumores), é o 1-*D*-MT o enantiômero mais eficiente na redução experimental de tumores. Esse dado sugere que o 1-MT pode ter ações adicionais à inibição da IDO. Neste estudo avaliamos os efeitos diretos dos estereoisômeros, 1-*D*-MT, 1-*L*-MT, 1-*DL*-MT, sobre melanomas humanos e também do composto 680C91 (um inibidor de TDO). Proliferação, migração e invasão são os ensaios usuais *in vitro* para avaliar como um determinado composto afetaria a progressão tumoral. Observamos que todos os compostos testados possuem algum efeito direto sobre pelo menos um desses parâmetros, sendo que esse efeito varia de acordo com a linhagem. Logo, todos eles possuem ação direta sobre a célula tumoral que deve contribuir com a atividade antineoplásica. Também analisamos os efeitos destes compostos sobre a ação tumorícida de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC). Em co-culturas, observamos que o 1-MT foi capaz de potencializar a atividade tumorícida de PBMC's e levou à diminuição da produção de IFN- γ e TNF- α e aumento de IL-10. Essas alterações não cursam com a inibição da produção de QUIN, o que nos faz pensar que esta ação de 1-MT sobre IFN- γ ocorre independente da enzima IDO e que parte dos efeitos antitumorais da 1-MT seja consequência de sua ação sobre a liberação destas citocinas. 1-MT também levou a modificações na concentração de outros metabólitos do Trp. Por fim, a co-cultura por si só aumentou o consumo de ácido xanturênico (XA) e aumentou a produção de ácido quinurênico (KA). Esse resultado parece significativo para a imunologia de tumores dado os efeitos biológicos destes compostos.

Palavras-chave: câncer, indolamina-2,3-dioxigenase, 1-metil-triptofano, imuno escape, IFN- γ .

ABSTRACT

BRANQUINHO, M.S.F. **Effects of IDO and TDO inhibitors in proliferation, migration and invasion of human melanomas and on tumoricidal activity of mononuclear cells.** 2015. 95f. (Master's thesis). Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2015.

In cancer, the increased expression of the enzymes indolamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) and tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO), that convert tryptophan (Trp) to kynurenine (KYN), has been associated with the mechanism of immune escape of tumoral cells and inhibitors of these enzymes have been considered as immuno-adjuvants in antitumor therapy. The most known is the 1-methyl-tryptophan (1-MT), a competitive inhibitor of IDO and a target in clinical trials. 1-MT is found in the enantiomeric forms *D*- and *L*- and although 1-*L*-MT is more efficient to inhibit IDO1 (the isoform more active in tumors), 1-*D*-MT is more efficient in experimental models. This fact suggests that 1-MT may have additional actions beyond IDO inhibition. In this study, we evaluated the direct effects of 1-*D*-MT, 1-*L*-MT and 1-*DL*-MT on human melanomas. We also tested the effects of the compound 680C91 (an inhibitor of TDO). Proliferation, migration and invasion are the usual in vitro tests to evaluate how a specific compound affects tumor progression. We observed that all of the tested compounds have some direct effect on at least one of these parameters depending on the cell lineage. Therefore, direct effects on proliferation, migration and invasion must compose the antineoplastic activity of these compounds. In co-cultures, we observed that 1-MT was able to potentiate the tumoricidal activity of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and led to a decreased production of IFN- γ and TNF- α , and an increase in IL-10. These changes were not linked with the inhibition of KYN production, and led us to consider that the effect of 1-MT on cytokine production occurs independently of the enzyme IDO and is part of its antitumor effects. 1-MT also led to changes in the concentration of other Trp metabolites. Finally, the co-culture by itself led to an increased consumption of xanthurenic acid (XA) and increased production of kynurenic acid (KA). This result seems significant to the immunology of tumors given the biological effects of these compounds.

Keywords: cancer, indoleamine-2,3-dioxygenase, 1-methyl-tryptophan, immuno escape IFN- γ .

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVEATURAS.....	16
LISTA DE FIGURAS.....	18
LISTA DE TABELAS.....	20
1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. Metabolismo do Triptofano.....	21
1.2. Metabolismo do Triptofano e Câncer.....	24
1.3. Câncer e Imunogenicidade.....	26
1.4. Enzimas IDO e TDO.....	28
1.5. Inibidores de IDO e TDO.....	30
1.6. Efeitos de 1-MT independentes de sua ação inibitória sobre IDO.....	32
2. OBJETIVOS.....	35
2.1. OBJETIVO GERAL.....	35
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1. Cultura de células.....	36
3.2. Quantificação de triptofano nas amostras de 1-MT.....	37
3.3. Ensaio de viabilidade celular por MTT (24h).....	37
3.4. Ensaio Clonogênico.....	38
3.5. Teste da ferida.....	38
3.6. Invasão celular <i>in vitro</i>	39
3.7. Co-cultura.....	40
3.7.1. Co-cultura em placas de 96 poços em formato de U.....	40
3.7.2. Co-cultura em placas de 12 poços.....	41
3.7.3. Produção de IFN- γ	41
3.7.4. Produção de IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-12 e TNF- α	41
3.7.5. Quantificação dos metabólitos do Trp.....	42

3.8. Análise do Ciclo Celular.....	43
3.9. Análise estatística.....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
CAP. 1: Efeitos diretos dos inibidores de IDO e TDO sobre a célula tumoral.....	45
CAP. 2: Efeitos sobre a resposta imunológica, mediados ou não pela enzima IDO.....	57
5. CONCLUSÕES.....	78
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
7. ANEXOS.....	89

LISTA DE ABREVEATURAS

1-D-MT: 1-*D*-metil-triptofano

1-DL-MT: 1-*DL*-metil-triptofano

1-L-MT: 1-*L*-metil-triptofano

1-MT: 1-metil-triptofano

5-HT: serotonina

5-OH-QUIM: 5-hidróxi-quinuramina

AA: ácido antranílico

ACS: 2-amino-3-carboximuconato semialdeído

AFMK: *N*1-acetil-*N*2-formil-5-metóxiquinuramina

AhR: receptor aril hidrocarboneto

AMK: *N*1-acetil- α 5-metoxiquinuramina

ATB: antibiótico

CBA: Cytometric Bead Array

DMT: *N-N*-dimetiltriptamina

f-QUIN: *N*-formil-quinurenina

HAA: ácido 3-hidróxi-antranílico

HIAA: ácido 5-hidróxi-indol-acético

HIAA-D2: ácido 5-hidróxi-indol-acético deuterado 2

HK: 3-hidróxi-quinurenina

IAA: ácido indolacético

IDO1: indolamina 2,3-dioxigenase 1

IDO2: indolamina 2,3-dioxigenase 2

IFN- γ : interferon-gama

IL-1 β : interleucina 1 beta

IL-6: interleucina 6

IL-8: interleucina 8

IL-10: interleucina 10

IL-12: interleucina 12

KA: ácido quinurênico

MLT: melatonina

MLT-D7: melatonina deuterada 7

NA: ácido nicotínico

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NAM: nicotinamida

NrN: nicotinato D-ribonucleotídeo

PA: ácido picolínico

PBMC: células mononucleares do sangue periférico

QA: ácido quinolínico

QUIN: *N*-quinurenina

SFB: soro fetal bovino

TDO: triptofano-2,3-dioxigenase

TME: triptofano-metil-éster

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

Trp: triptofano

TRY: triptamina

Via QUIN: via das quinureninas

Via SER/MLT: via serotoninérgica/melotoninérgica

Via TRY: via das triptaminas

XA: ácido xanturênico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via das quinureninas do catabolismo do TRP.....	22
Figura 2: Via das triptaminas do catabolismo do TRP.....	23
Figura 3: Via Serotoninérgica/Melatoninérgica do catabolismo de Trp.....	24
Figura 4: Estrutura das enzimas IDO e TDO.....	29
Figura 5: Reação de oxidação do triptofano pelas enzimas IDO e TDO originando <i>N</i> -formilquinurenina.....	29
Figura 6: Estrutura química dos enantiômeros de 1-MT.....	31
Figura 7: Estrutura química do composto 680C91.....	32
Figura 8: Porcentagem e concentração final de triptofano contaminante em todos os lotes de 1-MT.....	47
Figura 9: Triptofano existente em cada lote de 1-MT acrescida do triptofano contido em DMEM.....	48
Figura 10: Viabilidade celular na presença de diferentes concentrações de triptofano segundo o método de MTT.....	49
Figura 11: Proliferação da SK-Mel 19 na presença de 1-MT e 680C91.....	50
Figura 12: Proliferação da SK-Mel 147 na presença de 1-MT e 680C91.....	51
Figura 13: Migração da linhagem SK-Mel 19 na presença de 1-MT e 680C91.....	53
Figura 14: Migração da linhagem SK-Mel 147 na presença de 1-MT e 680C91.....	54

Figura 15: Invasão da SK-Mel 19 e da SK-Mel 147 na presença de 1-MT e 680C91.....	55
Figura 16: Padronização das co-culturas com diferentes proporções de célula tumoral e PBMC e diferentes concentrações de 1-DL-MT.....	58
Figura 17: Análise do ciclo celular segundo condições estipuladas na padronização...	60
Figura 18: Grupos de condições com as quais trabalhamos nas co-culturas realizadas em placas de 96 poços.....	61
Figura 19: Viabilidade celular segundo contagem com Azul de Tripán, após incubação de 72 horas em placa de 96 poços com fundo em U.....	62
Figura 20: Grupos de condições com as quais trabalhamos nas co-culturas realizadas em placas de 12 poços.....	64
Figura 21: Quantificação de citocinas inflamatórias, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12, IL-8 e IL-10.....	65
Figura 22: Concentração de Trp e QUIN no sobrenadante dos ensaios de co-cultura...	68
Figura 23: Concentração dos metabólitos da via QUIN (AA, KA, XA, QA, NA) no sobrenadante dos ensaios de co-cultura.....	72
Figura 24: Concentração de 5-HT e IAA no sobrenadante dos ensaios de co-cultura...	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Mutações apresentadas pelas linhagens de melanomas SK-Mel 19 e SK-Mel 147.....	36
---	----

1. INTRODUÇÃO

1.1. Metabolismo do Triptofano

O triptofano (Trp) é um aminoácido essencial que é utilizado para síntese proteica, mas também pode ser degradado por diferentes vias catabólicas e gerar compostos com diversas atividades biológicas (1, 2), sendo a via das quinureninas (Via QUIN) seu principal fluxo catabólico (**Fig. 1**). Nela, o Trp é oxidado a *N*-formil-quinurenina (f-QUIN) com subsequente deformilação por arilformidasas constitutivas, gerando o metabólito quinurenina (QUIN), o produto mais estudado da via QUIN.

Duas enzimas são responsáveis pela catálise do Trp à f-QUIN: a triptofano-2,3-dioxigenase (TDO) e indolamina-2,3-dioxigenase (IDO). A QUIN pode ser substrato de diferentes enzimas e gerar ácido antranílico (AA), 3-hidróxi-quinurenina (HK) e ácido quinurênico (KA) (3).

HK pode ser hidrolisado e produzir ácido xanturênico (XA) (4) e ácido 3-hidróxi-antranílico (HAA). HAA também pode ser sintetizado a partir da hidroxilação de AA. HAA por sua vez é convertido em 2-amino-3-carboximuconato semialdeído (ACS), que é rearranjado não enzimaticamente a ácido quinolínico (QA), que inicia o metabolismo de nicotinamida (NAM). ACS pode também ser descarboxilado e gerar 2-aminomuconato semialdeído que é rearranjado a ácido picolínico (PA) (1).

Os últimos passos da via QUIN são relacionados ao metabolismo de ácido nicotínico (NA) e nicotinamida (NAM) que é responsável, dentre outras moléculas, pela síntese de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+). Resumidamente, o ácido quinolínico (QA) é substrato da síntese de nicotinato D-ribonucleotídeo (NrN). Entre outras reações, NrN participa da síntese de vitamina B3, o ácido nicotínico (NA), nicotinamida (NAM) e NAD^+ . Assim, todos esses metabólitos: QA, NA e NAM podem ser usados por uma célula humana para sintetizar NAD^+ (5, 6).

Figura 1: Via das quinureninas do catabolismo do TRP (Via QUIN).

Outra via de metabolização do Trp, é a via serotoninérgica/melatoninérgica (via SER/MLT) (**Fig.2**). Essa via se inicia a partir da hidroxilação do Trp, e formação de 5-hidróxi-triptofano, com posterior descaboxilação gerando serotonina (5-HT) (7). Tanto 5-hidróxi-triptofano como a 5-HT podem sofrer ação da IDO e serem convertidos a 5-hidróxi-quinurenina e 5-hidróxi-quinuramina (5-OH-QUIM), respectivamente, o que demonstra que as vias QUIN e SER/MLT se intercomunicam entre si.

A 5-HT pode ser catalisada por monoamino oxidases e formar 5-hidróxi-indol-acetaldeído que gera o seu principal metabólito, o ácido 5-hidróxi-indol-acético (HIAA) (8, 9). Como produto do 5-hidróxi-indol-acetaldeído tem-se também, 5-hidróxi-triptofol, que é o metabólito de 5-HT encontrado em menor quantidade, representando apenas 1% do *turnover* de 5-HT (10). A formação dos dois produtos metabólicos da 5-HT, citados acima, são intimamente dependentes da relação NAD/NADH (11) já que as enzimas envolvidas utilizam essas moléculas como co-fator. Algumas células são capazes de utilizar 5-HT para a síntese de melatonina (MLT) através da rota

intermediada por *N*-acetilserotonina. A 5-HT é *N*-acetilada e metoxilada, gerando *N*-acetil-5-metóxi-triptamina, a melatonina (12, 13).

A melatonina tem capacidade de capturar radicais de oxigênio e gerar diferentes metabólitos (14). O metabólito *N*1-acetil-*N*2-formil-5-metóxiquinuramina (AFMK) é considerado o principal metabólito da melatonina, sendo obtido por reações com radicais hidroxila e oxigênio singlete, mas também pode ser produzido por catálise enzimática por mieloperoxidase de neutrófilos (15). O AFMK obtido por oxidação da MLT pode ser deformilado e dar origem a *N*1-acetil- α 5-metoxiquinuramina (AMK) (16). Juntos, AFMK e AMK são os principais metabólitos da melatonina.

Figura 2: Via Serotoninérgica/Melatoninérgica do catabolismo de Trp (Via SER/MTL).

Apesar das vias QUIN e SER/MLT somadas serem responsáveis pela quase totalidade do catabolismo de Trp, uma parte minoritária do Trp pode ser convertida em dimetiltryptamina (DMT) pela via das Triptaminas (Via TRY) (**Fig. 3**). O DMT é proveniente da metilação da triptamina (TRY), produzida a partir da descarboxilação do triptofano. A TRY possui também como metabólito o ácido indolacético (IAA).

Figura 3: Via das triptaminas do catabolismo do TRP (via TRY).

1.2. Metabolismo do Triptofano e Câncer

O catabolismo elevado do triptofano no câncer foi descrito pela primeira vez na década de 50 ao se analisar a urina de pacientes com neoplasia de bexiga. Posteriormente, foi detectada grande quantidade de metabólitos do triptofano também na urina de pacientes com câncer de mama, câncer de próstata, linfoma de Hodgkin e leucemia (17). Atualmente, novos estudos mostraram a relevância de metabólitos das três vias de catabolismo do triptofano, inclusive trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa descrevem essa relação (18, 19).

O esgotamento do Trp pode ter um efeito negativo sobre a proliferação celular, em especial a de células T, uma vez que a imunomodulação causada pela depleção do Trp influencia na tolerância de tumores, transplantes e até na implantação do feto (20). Esta depleção de triptofano tem como fator determinante a atividade das enzimas

indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) e triptofano-2,3-dioxigenase (TDO), resultando em produção de quinurenina (21). IDO está provavelmente relacionada à progressão do câncer, atuando como marcador de mau prognóstico na doença (22). Isso ocorre, pois QUIN tem efeitos tolerogênicos nas células dendríticas e suprime a atividade de células T (23), causando um efeito pró-tumoral (24). Sugere-se também, que a expressão de IDO pelo tumor pode inibir a ação das células NK e macrófagos (25).

TDO se encontra enzimaticamente ativa em vários tipos de câncer, sendo expressa em carcinoma da bexiga, carcinoma hepatocelular e melanoma. Estudos sobre sua atuação no câncer também vem ganhando atenção, uma vez que esta enzima pode ativar o receptor aril hidrocarboneto (AhR), por meio de produção de QUIN, e este receptor está diretamente relacionado ao crescimento e a motilidade celular (26, 27).

AhR é um fator de transcrição ativado por ligantes presentes em muitas células, que pode ligar estímulos químicos ambientais com respostas adaptativas, tais como desintoxicação, homeostase celular ou respostas imunes. Como exemplo disto, um artigo publicado em 2012 mostra tumores cerebrais humanos que utilizam o AhR para obter vantagens de crescimento (28). Outro trabalho do mesmo ano apresentou que a expressão de TDO em tumores impediu sua rejeição em modelos pré-clínicos de ratos imunizados, e, portanto, desenvolveram um inibidor de TDO que restaurou a capacidade desses animais de rejeitarem os tumores. Os resultados deste trabalho descrevem um mecanismo de resistência imunitária tumoral baseada na expressão de TDO e estabelece um conceito para o uso de seus inibidores na terapia contra o câncer (29).

Considerando esses estudos, a relação do metabolismo do Trp com a progressão e o desenvolvimento do câncer está intimamente envolvida com a supressão do sistema imunológico no microambiente tumoral.

1.3. Câncer e Imunogenicidade

A compreensão da fisiopatologia do câncer depende dos mecanismos imunológicos nela envolvidos. Recentemente, tem sido sugerido que o sistema imune não responde ao não-próprio, mas sim a bruscas alterações nos padrões antigênicos com os quais ele está em contato (30).

Posto isto, espera-se que o sistema imunológico possua habilidade protetora contra o câncer, porém as células tumorais conseguem modificar o microambiente ao seu redor, na tentativa de favorecer sua progressão. Esta disputa entre os dois tipos celulares mostra que um sistema imunológico ativo pode erradicar o câncer, assim como o câncer também pode escapar do sistema imunológico. Desta forma, o balanço entre imunossupressão e imunoestimulação no microambiente tumoral tem profundas implicações para a eliminação, equilíbrio e escape do tumor (31, 32).

A atuação do sistema imune envolve respostas do sistema imunológico inato e adaptativo. Linfócitos T, células NK e macrófagos protegem o organismo quando ainda não existem evidências clínicas da doença, e se as células tumorais forem extintas, ocorreu então um processo de eliminação do tumor ainda em fase inicial. Vários estudos têm mostrado a participação de cada uma dessas células em tumores específicos. Em melanomas, as células T desempenham uma resposta eficiente por meio da ação efetora de células T $CD8^+$ e T $CD4^+$ (33). Os linfócitos NK que também compõe o sistema imune inato identificam e destroem células que perderam o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) I decorrente de uma transformação tumoral (34). Por este motivo, essas células desempenham um importante papel na erradicação de tumores durante a formação do tumor primário e também após o estabelecimento de metástases (35). No microambiente tumoral ainda estão presentes os macrófagos que aparecem em

maior quantidade em lesões primárias e em menor, nas metastáticas. Essas células podem tanto atuar no combate do tumor quanto sofrer uma ativação alternativa que resulta na inibição do sistema imunológico e desta forma, favorecem a tolerância e a progressão tumoral (34).

Se células tumorais não forem erradicadas pelo sistema imune nas fases iniciais, numa etapa seguinte elas desenvolvem a capacidade de colonizar sítios em tecidos do hospedeiro, porém o sistema imune ainda consegue contê-las, caracterizando um equilíbrio imunológico. Entretanto existe também uma terceira possibilidade, que acontece quando as células tumorais desenvolvem a capacidade de contornar e suprimir o sistema imunológico do hospedeiro, tomando o controle da situação. Este processo é chamado de imune escape e garante que a lesão tumoral progrida e a doença torne-se aparente, dando início as limitações no tratamento do câncer (17). O imune escape das células tumorais acontece porque a maioria dos tumores são formados por células do próprio organismo, o que faz com que o sistema imune comece a trabalhar mais tardiamente. Além disso, as células tumorais são capazes de desenvolver várias táticas para evadir o sistema imune (33). Dentre os mecanismos moleculares envolvidos no imune escape podemos citar, alteração da expressão de HLA clássico e não clássico, diminuição de antígenos tumorais, perda de moléculas co-estimulatórias importantes na resposta imunológica, produção de citocinas imunossupressoras, dentre outros (36).

No contexto do imune escape se sobressaem as enzimas IDO e TDO, que produzem QUIN, e por este motivo apresentam atividades imunossupressoras, atuando assim no microambiente tumoral de forma a favorecer o escape imunológico das células tumorais.

1.4. Enzimas IDO e TDO

Como dito anteriormente, indolamina 2,3-dioxigenase e triptofano 2,3-dioxigenase são as enzimas responsáveis pelo passo inicial e limitante da velocidade na via QUIN (20). IDO pode ser induzida por interferon- γ (IFN- γ) e é expressa na maioria dos tecidos humanos. Outras citocinas ou lipopolissacáridos também são capazes de induzir IDO, embora de forma menos efetiva (37). TDO pode ser induzida por glicocorticoides, cortisol e estresse (38), e é expressa principalmente no fígado de seres humanos, mas após estímulos pode ser detectada também em outros tecidos, incluindo a placenta, útero gravídico, epidídimo, testículos e cérebro (27). Estas enzimas apresentam características imunossupressoras e estão ligadas a uma variedade de condições fisiológicas e fisiopatológicas imuno-relacionadas (37).

IDO é uma proteína monomérica que contém um domínio C-terminal, um N-terminal e um grupo heme em sua estrutura. O domínio C-terminal é essencialmente idêntico ao monômero de TDO, e as estruturas são facilmente sobreponíveis. A região que liga os dois domínios é extensa e eles são unidos por um *loop* (39). A enzima TDO possui estrutura tetramérica com um heme por monômero, sendo que os resíduos N-terminais de cada monômero estão inseridos no local de ligação do substrato no monômero adjacente. A região N-terminal encontra-se acima da face distal do heme, formando parte da cavidade de ligação. A estrutura da enzima é completamente helicoidal, e um *loop* flexível, envolvido na ligação do Trp, é observado na parte exterior do grupo heme (**Fig. 4**) (39). Mesmo TDO sendo tetramérica e IDO monomérica, elas apresentam grande semelhança estrutural entre si, que pode ser explicada pela estrutura de alinhamento das sequências (39).

Figura 1: (A) Estrutura de IDO. O domínio *N*-terminal menor é mostrado em cinza e o domínio *C*-terminal é mostrado em azul. (B) Estrutura de TDO. O triptofano é representado pelas estruturas em vermelho e os monômeros diferentes são mostrados em lilás, verde, cinza e azul (39).

A oxidação do Trp ocorre por meio da inserção de dois átomos de oxigênio no seu anel pirrólico (**Fig. 5**). O mecanismo de clivagem do anel indólico envolve a abstração de próton pelo O_2 ligado ao ferro (que passa do seu estado férrico a ferroso), seguindo de adição eletrofílica do oxigênio, atacando a dupla ligação entre os carbonos C2 e C3 do anel indólico.

Figura 2: Reação de oxidação do triptofano pelas enzimas IDO e TDO originando *N*-formil-quinurenina.

IDO e TDO seguem mecanismos de ação semelhantes, porém diferenças sutis distinguem as duas reações enzimáticas. IDO reage preferencialmente com superóxido,

podendo reagir também com oxigênio para catalisar Trp ou outras indolaminas, enquanto TDO reage apenas com o oxigênio e é específico para Trp e alguns de seus derivados substituídos na posição 5 e 6 (40).

Existem duas isoformas de IDO que apresentam 43% de similaridade entre si, sendo elas IDO1 e IDO2. IDO2 foi descoberta em 2007, e o seu gene de codificação é adjacente ao da IDO1 no cromossoma 8, sugerindo um produto de duplicação de genes. As duas enzimas são capazes de oxidar Trp em f-QUIN, porém a IDO2 é menos eficiente nesta função e apesar de ser expressa em células tumorais, ela parece não ser ativa no microambiente tumoral (21, 41).

Com base nos mecanismos de tolerância induzida por IDO e TDO citados nos itens anteriores, o bloqueio dessas enzimas pode ser clinicamente útil para impedir a imunossupressão local. E o 1-metiltriptofano (1-MT), tem sido o inibidor mais estudado neste contexto.

1.5. Inibidores de IDO e TDO

Em 1991 estudos com intestino delgado de coelho mostraram que o 1-metiltriptofano (1-MT) era um inibidor competitivo da IDO (42). Desde então, vários grupos descrevem a inibição da atividade de IDO por 1-MT, em várias espécies, e um dado que merece relevância nesses trabalhos é a diminuição da função imunoreguladora da IDO na presença deste inibidor (18, 24, 43, 44). Esta diminuição pode ser ilustrada pelo aumento da proliferação tanto de células mononucleares do sangue periférico (45) quanto em culturas de linfócitos T CD4⁺ (46). Além disso, a administração *in vivo* de 1-MT bloqueia o efeito imunossupressor da IDO (47, 48).

1-MT existe em duas formas (**Fig. 6**), o enantiômero levógiro (1-*L*-MT) e o enantiômero dextrógiro (1-*D*-MT), sendo encontrado também na forma da mistura

racêmica (1-*DL*-MT), que possui em torno de 50% de cada um dos enantiômeros. Embora a atividade da enzima IDO1 seja inibida mais eficientemente por 1-*L*-MT *in vitro*, 1-*D*-MT é mais efetiva no aumento de respostas antitumorais *in vivo* (49, 50), e por este motivo é esta a isoforma em análise nos *clinical trials* como um imunoadjuvante na terapia do câncer (51).

Figura 3: Estrutura química dos enantiômeros de 1-MT, o inibidor de IDO.

Estudos de farmacodinâmica e farmacocinética do 1-MT são ainda insuficientes. Um deles, publicado em 2007 mostra as características de biodisponibilidade e segurança de 1-*D*-MT. O composto apresenta boa estabilidade e elevada biodisponibilidade que podem variar entre diferentes espécies. No que diz respeito à toxicidade, 1-*D*-MT não produz efeitos adversos significativos ou alterações hematológicas e bioquímicas (52).

Quando comparado ao triptofano, o enantiômero dextrogiro de 1-MT, após administração oral em ratos apresentou-se menos ligado a proteínas plasmáticas, o que pode ser devido à adição do grupo metila e a maior concentração do composto foi detectada no rim, seguido do fígado, músculo, coração, pulmão e baço respectivamente, sendo que 35% da sua excreção se deu pela urina, restando apenas 15% nas fezes (52).

O composto 680C91 (**Fig. 7**) é um potente inibidor de TDO, sendo seletivo para este substrato quando comparado a uma série de outras enzimas e receptores que modulam o metabolismo do triptofano. Eficaz não só para células isoladas, mas também em sistemas mais complexos, este inibidor de TDO tem sido explorado quanto ao seu papel na regulação do metabolismo de triptofano, relacionando-o ao microambiente inflamatório e tumoral (53).

Figura 4: Estrutura química do inibidor de TDO, composto 680C91.

Um dado importante neste contexto é que 680C91 não apresenta capacidade inibitória sobre a enzima IDO, assim como nenhuma das isoformas de 1-MT inibem TDO (54).

1.6. Efeitos de 1-MT independentes de sua ação inibitória sobre IDO.

Como mencionado anteriormente, vários estudos se dedicam a identificar novos inibidores e decifrar mecanismos de ação destes compostos. Nosso interesse reside tanto na ação destes compostos como inibidores de IDO e TDO, quanto na identificação de efeitos não mediados pela IDO sobre a célula tumoral. Destacando que estes podem contribuir como um dos fatores na terapia antineoplásica.

Conhecida a existência de duas formas enantioméricas do inibidor de IDO e da atuação de IDO1 e IDO2 sobre o metabolismo do triptofano, é importante destacar que, 1-*L*-MT é mais eficiente na inibição da IDO1 e 1-*D*-MT é mais hábil na redução experimental de tumores. Sendo IDO1 a isoforma mais ativa em tumores, esse dado sugere que o 1-MT possa ter ações que independam de qualquer isoforma de IDO, atuando diretamente contra ao câncer (21).

Uma publicação anterior do grupo descreveu que 1-*DL*-MT diminui a capacidade clonogênica de melanomas e gliomas humanos. Este mesmo trabalho mostra que a inibição de IDO por 1-MT, avaliada por meio da quantificação de QUIN nas mesmas linhagens de melanomas usadas aqui (SK-Mel 19 e SK-Mel 147), só ocorre na presença de IFN- γ , indicando que estas células não expressam IDO espontaneamente (18).

Um outro exemplo da ação de 1-MT independente de sua inibição sobre IDO foi publicado em 2006 por Agaugué e colaboradores. Eles observaram que os efeitos do 1-MT na maturação de células dendríticas não estão correlacionadas com a inibição da atividade de IDO. Isto porque 1-MT possui efeitos distintos sobre a maturação desencadeada por duas substâncias que induzem a mesma atividade sobre IDO. Além disso, 1-MT modifica as propriedades funcionais das células dendríticas tratados com peptídeos glicanos sem afetar a atividade de IDO dessas células (55).

Desta maneira sabemos que 1-MT pode ter várias funções além de inibir IDO que podem contribuir para os efeitos *in vivo* e os enantiômeros podem atuar em substratos distintos, e é neste âmbito que o nosso trabalho se insere. Inicialmente, utilizando condições nas quais IDO não é expressa, ou seja células não ativadas por IFN- γ , quisemos avaliar o efeitos diretos dos estereoisômeros, 1-*D*-MT, 1-*L*-MT, 1-*DL*-MT, sobre melanomas humanos. Em uma segunda etapa do trabalho, analisamos os

efeitos destes compostos sobre a ação tumoricida de células do sistema imunológico, sendo estes efeitos, modulados ou não pela enzima IDO. Com estes resultados evidenciamos atividades adicionais que podem cooperar para a eficiência terapêutica destes diferentes enantiômeros.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

No presente trabalho avaliamos os efeitos diretos e os efeitos sobre o sistema imunológico, mediado ou não pela enzima indoleamina-2,3-dioxigenase, dos compostos 1-*D*-MT, 1-*L*-MT, 1-*DL*-MT e 680C91.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar os efeitos diretos de 1-*D*-MT, 1-*L*-MT, 1-*DL*-MT e 680C91 na proliferação, migração e invasão de melanomas humanos;
- Avaliar a atuação destes inibidores na atividade antitumoral de células do sistema imune, acompanhada em co-culturas de linhagens tumorais com PBMC;
- Identificar as possíveis ações do 1-MT sobre passos do metabolismo do Trp, incluindo as três rotas conhecidas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultura de células

Os experimentos foram realizados com duas linhagens de melanomas humanos metastáticos: SK-Mel-19 e SK-Mel-147. Optamos por este modelo experimental devido a grande relevância deste tipo de câncer, além dos vários estudos envolvendo esse tipo tumoral com respostas positivas que já se encontram em *clinical trials* (51). Em adição, SK-Mel 19 e SK-Mel 147 são linhagens com as quais o grupo de pesquisa já possui familiaridade e uma coleção de dados (18) que poderá sustentar as conclusões aqui encontradas. Estas linhagens de melanomas possuem mutações específicas que estão descritas na tabela 1.

As células foram mantidas e cultivadas em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico (ATB; 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina), sob 37° C em atmosfera úmida constituída de 5% de CO₂.

Linhagens estudadas	BRAF	NRAS	p53	PTEN
SK-Mel 19	Mutante (V600E)	w	w	-
SK-Mel 147	w	Q61R	w ^R	+

Tabela 1: Mutações apresentadas pelas duas linhagens de células utilizadas neste trabalho. w^R: linhagem selvagem para o gene p 53 apresentando polimorfismo em P72R. (56)

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas por gradiente de densidade e mantidas durante os experimentos em RPMI (Gibco) suplementado com 3% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico (ATB; 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina) sob 37° C em atmosfera úmida constituída de 5% de CO₂.

3.2. Quantificação de triptofano nas amostras de 1-MT

A quantificação de triptofano nas amostras de 1-MT foi realizada por espectrometria de massas, em colaboração com o Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas do Professor Dr. Ernani Pinto Júnior. A concentração deste analito foi quantificada a partir de uma curva padrão de triptofano. Para todos os ensaios realizados neste trabalho com os inibidores de IDO, foram utilizados lotes fixos de 1-MT. O ajuste da porcentagem de triptofano nestes lotes foi feito através da sua adição nas soluções todas as vezes em que elas foram preparadas, igualando desta forma as concentrações nos diferentes enantiômeros.

3.3. Ensaio de viabilidade celular por MTT (24h)

Foram plaqueadas 7×10^3 células/poço para a SK-Mel 147 e 11×10^3 células/poço para a SK-Mel 19 em 200 μ l de suspensão celular. Posteriormente a placa foi incubada sob 37° C em atmosfera úmida constituída de 5% de CO₂ por 24 horas. Após este período o meio de cultura foi retirado e as células foram tratadas com 200 μ l das soluções de triptofano nas concentrações testadas (100, 150 e 200 μ M) e da solução controle (apenas o Trp já contido no meio de cultura). A placa foi novamente incubada nas mesmas condições anteriores e ao final das 24 horas o tratamento foi retirado e os poços lavados duas vezes com 200 μ l de PBS estéril a temperatura de 37°C.

Foi feita uma solução de MTT 5mg/ml em PBS que então foi diluída 1:5 em DMEM sem SFB. Em seguida foi adicionado 200 μ l desta solução de MTT (0,5mg/mL) em cada poço e então a placa foi incubada por 3 horas. Após a retirada da solução de MTT da placa, foram adicionados a todos os poços 200 μ l de DMSO puro. Para a leitura a 570 nM a placa foi agitada no próprio leitor de absorbância por 10 segundos.

3.4. Ensaio Clonogênico

A análise da proliferação das células foi realizada por meio do ensaio clonogênico. Ensaio de formação de colônia ou ensaio clonogênico é um teste *in vitro* que pondera a capacidade de uma única célula crescer e se multiplicar formando uma colônia (48).

Para isso, as duas linhagens de melanomas estudados foram cultivadas em placas de seis poços em uma densidade de 300 células por poço. Após três dias de incubação sob 37° C em atmosfera úmida constituída de 5% de CO₂, meio de cultura fresco, condicionado ou não com diferentes tratamentos, foi adicionado aos poços. Este procedimento foi realizado a cada dois dias, totalizando de 12 a 15 dias, dependendo da quantidade de colônias formadas para cada linhagem celular. Após esta etapa, as células foram lavadas com PBS gelado, fixadas e coradas em solução de glutaraldeído 25% e cristal violeta 2% por três horas. Após sucessivas lavagens com água destilada para retirar o excesso de cristal violeta, as placas foram deixadas à temperatura ambiente para secarem. O tamanho e a quantidade das colônias foram calculados usando o software de imagem CARESTREAM MOLECULAR da In-Vivo MS FX-PRO (Carestream Health Inc., Woodbridge, CT, EUA).

3.5. Teste da ferida

A migração é definida como o movimento dirigido de células em um substrato, tal como membranas basais ou placas de plástico. O teste da ferida ou *scratch test* é um ensaio *in vitro* utilizado para medir a capacidade migratória das células sobre uma superfície (57).

Foram plaqueadas em placas de 24 poços, 1×10^5 células/poço de SK-Mel 147 e 2×10^5 células/poço de SK-Mel 19. As duas linhagens de melanomas foram cultivadas

até confluência de 90%. Nesta condição, uma ferida foi feita no centro da monocamada celular. Meio de cultura condicionado ou não com os tratamentos, foi adicionado ao poço e imediatamente, imagens digitais foram obtidas e denominadas “tempo zero”. Estas foram posteriormente utilizadas para o cálculo da área migrada. As células foram então incubadas por 24 horas (SK-Mel 147) e por 36 horas (SK-Mel 19), o parâmetro utilizado para a finalização do experimento foi o fechamento quase total da cicatriz na célula controle. Neste momento, novas imagens digitais foram obtidas e a área migrada foi quantificada pelo programa Axiovision®.

3.6. Invasão celular *in vitro*

A invasão requer capacidade migratória das células e o que difere esses processos é a existência de uma barreira a ser transposta. A migração é um movimento em 2D sobre uma superfície, enquanto a invasão envolve a transposição 3D das células por uma camada de matrigel (58). O princípio deste ensaio é baseado em duas câmaras separadas por uma membrana porosa, através do qual as células transmigram. Este é um ensaio *endpoint*, ou seja, o tempo ótimo de análise deve ser determinado individualmente para cada tipo de célula testada (59).

Neste estudo, a invasão foi realizada por testes em *transwell* ou câmaras de Boyden. Para isso, as câmaras (8 μ m, BD®) foram colocadas em placas de 24 poços. Matrigel (BD®) foi diluído 1:10 em DMEM sem soro e adicionado sobre a membrana da câmara. As células foram plaqueadas (1×10^5 células/mL) no compartimento interno da câmara em uma suspensão de 200 μ L de DMEM com SFB 3% na presença ou ausência de tratamento. 400 μ L de DMEM com SFB 3% foram adicionados no compartimento externo à câmara de Boyden. O tempo de incubação foi de 48 horas para as duas linhagens de melanomas. As células que invadiram através do matrigel foram

fixadas com glutaraldeído 5%, lavadas 3x com água destilada e então coradas com solução de azul de toluidina 2%. Após nova lavagem com água destilada para retirada do excesso de corante, o compartimento interno da câmara foi limpo com hastes de algodão. Dez imagens de campos distintos foram capturas para cada poço da placa, e a partir destas imagens as células que invadiram foram quantificadas.

3.7. Co-cultura

A co-cultura celular é uma metodologia onde dois ou mais tipos de células diferentes são cultivados simultaneamente e no mesmo espaço. Neste trabalho, para representar as células do sistema imune, utilizamos células mononucleares do sangue periférico (PBMC), compostas principalmente por linfócitos e monócitos. Estas células são cultivadas juntamente com células de melanoma, na presença ou não de inibidores.

Foram realizados dois desenhos experimentais distintos para as co-culturas, em um primeiro momento visamos o contato das células por meio da utilização de placas de 96 poços em formato de U, porém este desenho não favorecia as quantificações no sobrenadante dessas co-culturas. Desta forma, um novo desenho foi feito, onde utilizamos placas de 12 poços, as quais não beneficiam o contato entre os dois tipos celulares, mas possibilita a realização do experimento com uma quantidade maior de meio de cultura, e assim foi possível usar o sobrenadante para ensaios de quantificação de citocinas e metabólitos do Trp.

3.7.1. Co-cultura em placas de 96 poços em formato de U

Foram plaqueadas 5×10^3 células de SK-Mel 19 por poço e 2×10^3 células de SK-Mel 147 em 200 μ L de DMEM 10% SFB em placas de 96 poços em formato de U. Após as 24 horas de incubação, sangue periférico de pessoas saudáveis foi coletado em heparina e as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas dos

outros componentes do sangue por gradiente de densidade com Histopaque®-1077. Essas células de PBMC foram contabilizadas e colocadas em cultura na presença do tratamento requerido e 200 µL de meio de cultura RPMI 3% SFB, juntamente com as células tumorais plaqueadas no dia anterior. Após 72 horas de incubação, as células tumorais foram quantificadas em câmara de Neubauer na presença de solução de TRIPAN®.

3.7.2. Co-cultura em placas de 12 poços

Foram plaqueadas 1×10^5 células de SK-Mel 19 por poço e 3×10^4 células de SK-Mel 147 em 1000 µL de DMEM 10% SFB em placas de 12 poços. Após as 24 horas de incubação, as PBMC's foram isoladas e quantificadas como citados no item anterior e posteriormente elas foram colocadas em cultura juntamente com as células tumorais. Após 48 horas de incubação, o sobrenadante foi recolhido para quantificação de citocinas e metabólitos do Trp.

3.7.3. Produção de IFN- γ

A produção de IFN- γ pelas células em co-cultura foi avaliada pela técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunsorbent Assay) a partir do kit Human Interferon- γ ELISA kit (Life Technologies). Para a análise utilizamos 100 µL do sobrenadante das co-culturas e as amostras não foram diluídas.

3.7.4. Produção de IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-12 e TNF- α

A produção dessas citocinas foi analisada simultaneamente por citometria de fluxo (FACS Calibur; Becton-Dickinson) pela técnica de Cytometric Bead Array (CBA) da BD™. Para a análise utilizamos 25 µL do sobrenadante das co-culturas.

3.7.5. Quantificação dos metabólitos do Trp

A quantificação dos metabólitos do triptofano foi realizada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo LC-MS/MS (QqQ). O equipamento utilizado é composto por Bombas LC 1250 Bin Pump VL, auto-injetora 1260 HiP ALS acoplados ao espectrômetro de massas 6460 (todos da Agilent Technologies), a partir de uma colaboração com o Prof. Dr. Ernani Pinto, professor do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. As análises foram realizadas a partir do software MassHunter e os dados serão coletados a partir do modo MRM (Multiple Reaction Monitoring).

Para o preparo das amostras, o sobrenadante das co-culturas (500 µL) foi adicionado a um microtubo de 2 mL contendo 1,5 mL de metanol gelado. Após adição das amostras, 10 µL de um *mix* de padrões internos (MLT-D7 417,9 nM, TME 5 µL e HIAA-D2 5 µL) para os analitos estudos, foi adicionado ao microtubo. Posteriormente, homogeneizamos em vortex por 1 min e então armazenamos essas soluções por 1 hora a -20°C para precipitação das proteínas do meio de cultura. Após a 1 hora de incubação, os microtubos foram submetidos a centrifugação a 14.000 x *g* por 10 min a 4 °C. O sobrenadante dos microtubos foi filtrado em coluna, em placa *Phree Phospholipid Removal* (Phenomenex, EUA) para remoção de proteínas e fosfolipídios da amostra. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos de vidro e secas sob atmosfera de gás nitrogênio. Ao final da secagem, as amostras foram reconstituídas em 100 µL de uma mistura de água:metanol (9:1) contendo 0,1 % de ácido fórmico e filtradas em tubos do tipo Spin-X® (Costar ®- em membrana de nylon, 0,22 µm) para então serem analisadas por cromatografia líquida.

3.8. Análise do Ciclo Celular

As células foram plaqueadas (1×10^5 células de SK-Mel 19 por poço e 5×10^4 células de SK-Mel 147 por poço) em 2 mL de RPMI 3% SFB em placas de 6 wells. Após 24 horas de incubação em estufa sob 37°C e atmosfera úmida constituída de 5% de CO_2 , foi adicionado meio de cultura acrescido dos tratamentos. Após 72 de incubação, o sobrenadante de cada poço foi recolhido e centrifugado. Após a tripsinização, as células foram recolhidas nos mesmos tubos com o pellet da centrifugação anterior e centrifugadas novamente. Então as células foram lavadas com PBS e ressuspendidas em solução contendo 2 mg/mL de Iodeto de Propídio, 0,1% de citrato de sódio e 0,1 % de Triton X-100. As células foram incubadas sob abrigo de luz por 30 minutos e posteriormente a proporção de células em cada fase do ciclo celular foi determinada citometria de fluxo (FACS Calibur; Becton-Dickinson) e os dados analisados pelo software FlowJo.

3.9. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em um n de no mínimo três valores independentes. A análise estatística foi realizada por Test t de Student quando o desejado era a comparação do controle com um único tratamento; e por ONE Way ANOVA seguido do pós teste de Tukey quando desejamos comparar todos os tratamentos entre si e também com controle. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visando o maior entendimento dos resultados obtidos durante a realização deste projeto, a presente seção será dividida em dois capítulos. No capítulo 1 serão apresentados os resultados referentes à quantificação de triptofano nos lotes de 1-MT e aos efeitos diretos dos inibidores de IDO e TDO sobre a célula tumoral. No capítulo 2 serão apresentados os resultados obtidos com o ensaio de co-cultura, englobando os efeitos sobre a resposta imunológica, mediados ou não pela enzima IDO.

**CAPÍTULO 1: *Efeitos diretos dos inibidores de IDO e TDO
sobre a célula tumoral.***

Em 2012 foi publicado um artigo mostrando a existência de contaminação com Trp em amostras de 1-MT (60). Sabendo-se disso, todos os estudos realizados com este inibidor da indolamina-2,3-dioxigenase até esta data perderam a confiabilidade, uma vez que a presença de altas concentrações de Trp nestes compostos e a variação destas concentrações de enantiômero para enantiômero e também entre diferentes lotes, pode causar resultados falsos.

Desta forma, para utilização dos dois enantiômeros e da mistura racêmica de 1-MT e para a comparação entre eles neste trabalho, viu-se a necessidade de dosar e posteriormente nivelar a concentração de Trp em todos os lotes de 1-MT utilizados. Para isto, o primeiro resultado apresentado nesta seção foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Ernani Pinto e sua aluna de doutorado Ariane Rivellis Júlio e mostra a concentração de Trp em todos os lotes de 1-MT existentes no laboratório.

Como previsto, os sete lotes de 1-MT analisados apresentaram alguma quantidade de Trp, sendo que a porcentagem do aminoácido variou de 1,93 a 8,4 (**Fig. 8. A**). A purificação do contaminante é bastante trabalhosa e demorada. Assim, nossa estratégia foi normalizar a quantidade de Trp através da sua adição, estipulando uma concentração fixa do aminoácido. Em todos os experimentos nos quais 1-MT foi adicionado tomamos o cuidado de adicionar quantidades de Trp para que as soluções apresentassem a mesma concentração final (150 μ M). Após essas dosagens de Trp contaminante trabalhamos com um mesmo lote de cada composto para todos os experimentos. Esse mesmo cuidado foi tomado quando 1-MT foi adicionado a culturas de células, e observamos que houve aumento nas concentrações de Trp, o que pode ser explicado por esta contaminação. Vemos na figura 8.B. que as variações da concentração final de Trp se mantiveram similares para 1-*DL*-MT, 1-*D*-MT e 1-*L*-MT. Para ilustrar essa condição mostramos abaixo a concentração de Trp com os

enantiômeros e a mistura racêmica nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC's) e na linhagem de melanoma SK-Mel 19.

Figura 8: (A) Contaminação de triptofano existente em todos os lotes de 1-DL-MT, 1-D-MT e 1-L-MT. (B) Concentração final de triptofano em culturas celulares (SK-Mel 19 e PBMC) nas quais foram adicionados 1-DL-MT, 1-D-MT e 1-L-MT. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de uma duplicata. O teste estatístico utilizado foi ONE Way ANOVA seguido de Tukey. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

Como o meio de cultura utilizado (DMEM) possui aproximadamente 50 μ M de triptofano e a adição de 1mM de 1-MT elevaria esta concentração em até 100 μ M, nós normalizamos a concentração de Trp para 150 μ M em todos os ensaios (Fig. 9).

Figura 9: Triptofano existente em cada lote de 1-*DL*-MT, 1-*D*-MT e 1-*L*-MT acrescida do triptofano contido no meio de cultura (DMEM).

Considerando que estávamos elevando significativamente a concentração de Trp no meio de cultura, foi necessária a pesquisa da viabilidade celular. Com esta finalidade fizemos ensaios de MTT e da capacidade clonogênica com as duas linhagens de células utilizadas como modelo neste trabalho. Trp na concentração de 150 μM , ou até superior (200 μM e 250 μM) não causou nenhuma alteração na viabilidade e clonogenicidade destas células. O ensaio de MTT é realizado em tempos curtos (24 h) enquanto que o ensaio clonogênico permite avaliar efeitos tóxicos ou proliferativos a longo prazo (15 dias) (**Fig. 10**).

Figura 10: Viabilidade celular na presença de diferentes concentrações de triptofano segundo o método de MTT para as linhagens (A) SK-Mel 19 e (B) SK-Mel 147. (C) Imagens digitalizadas representativas do ensaio clonogênico em diferentes concentrações de triptofano com as linhagens SK-Mel 147 e SK-Mel 19. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em duplicatas.

Nenhuma das concentrações de Trp testadas alterou a viabilidade dessas linhagens de melanomas, garantindo assim a segurança de trabalharmos nessas condições. Nos ensaios de proliferação, migração e invasão destas células utilizamos 1 mM de 1-MT, lembrando que em todas as vezes que foram preparadas estas soluções para realização dos experimentos, foi adicionada quantidade de Trp suficiente para igualar a concentração do aminoácido nos dois enantiômeros e na mistura racêmica.

Nos experimentos a seguir também mostramos o efeito do composto 680C91 (20 μ M) que é um inibidor da TDO, entretanto devido a baixa solubilidade e alta toxicidade não avançamos muito com esse inibidor e no capítulo 2 nos concentramos apenas com as isoformas de 1-MT.

Para avaliarmos os efeitos diretos de 1-MT e 680C91 sobre a célula tumoral o primeiro ensaio realizado foi o teste clonogênico.

Figura 11: (A) Imagens representativas digitalizadas por MS FX-PRO dos ensaios clonogênicos da célula SK-Mel 19. (B) Número, (C) área e (D) intensidade da coloração das colônias de acordo com o tratamento. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. O teste estatístico utilizado foi ONE Way ANOVA seguido de Tukey. ** $p < 0,01$ em relação do controle.

No ensaio de proliferação realizado para a linhagem SK-Mel 19, o número de colônias aumentou na presença de 1-D-MT durante 15 dias (**Fig. 11**). Por outro lado a área e a intensidade de coloração das colônias não tiveram alteração significativa na presença de nenhum dos tratamentos.

Figura 12: (A) Imagens representativas digitalizadas por MS FX-PRO dos ensaios clonogênicos da célula SK-Mel 147. (B) Número, (C) área e (D) intensidade da coloração das colônias de acordo com o tratamento. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independente. O teste estatístico utilizado foi ONE Way ANOVA seguido de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, todos em relação ao controle.

Os enantiômeros e a mistura racêmica do 1-MT, assim como o composto 680C91 diminuíram a área das colônias de células SK-Mel 147 segundo o ensaio clonogênico de 12 dias (**Fig. 12**). O maior efeito de 680C91 desta linhagem de melanoma pode ser resultado da sua toxicidade. Não foi observada diferença significativa entre as formas de 1-MT neste experimento.

De uma forma geral, observamos que os compostos 680C91 e 1-MT podem afetar a clonogenicidade dependendo da linhagem de células. A SK-Mel 19 foi bem menos responsiva que a SK-Mel 147 e apresentou aumento do número de colônias na presença de 1-*D*-MT. Para a SK-Mel 147 predominou uma resposta inibitória.

O ensaio clonogênico é uma ferramenta clássica muito utilizada para avaliação do efeito de diferentes compostos sobre a capacidade proliferativa de células tumorais. Este ensaio monitora uma das muitas etapas envolvidas e necessárias à expansão tumoral. Ao observarmos os resultados referentes ao efeito de 1-*D*-MT sobre a SK-Mel 19 vemos um efeito “pró-tumoral” em uma das etapas da progressão tumoral. Apesar de isoladamente o ensaio clonogênico não poder confirmar a ação de uma substância, o resultado encontrado merece atenção e pode servir como um alerta à utilização de 1-*D*-MT. Para avaliar a eficiência da utilização de 1-MT talvez fosse válida uma análise individualizada da resposta das células de cada paciente antes da sua utilização clínica.

O efeito de 680C91 e 1-MT também foi avaliado sobre a capacidade migratória das linhagens de melanoma e analisada por meio do teste de cicatriz, também conhecido por *scratch* teste, nas mesmas concentrações em que realizamos o ensaio clonogênico. O tempo de incubação das células dependeu do tempo de dobramento de cada linhagem. O ensaio com a linhagem SK-Mel 19 foi incubado por 36 horas e não foi observada nenhuma alteração na migração com 1-MT e 680C91 (**Fig. 13**).

Figura 13: (A) Imagem representativa digitalizada da migração da linhagem SK-Mel 19 na presença de 680C91 e 1-MT. (B) Porcentagem de migração das células das linhagens SK-Mel 19 de acordo com os tratamentos utilizados. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata.

A linhagem SK-Mel 147 foi incubada por 24 horas, e assim como na linhagem SK-Mel 19, se manteve sem alterações na porcentagem de migração quanto tratadas com estes compostos (Fig. 14).

Figura 14: (A) Imagem representativa digitalizada da migração da linhagem SK-Mel 147. (B) Porcentagem de migração das células das linhagens SK-Mel 147 de acordo com os tratamentos utilizados. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata.

Assim como o clonogênico, o *scratch* teste é um ensaio clássico que isoladamente não estabelece uma atividade pró ou antitumoral para substância em análise, mas compõe os testes que a indicam. Alterações na migração celular não parecem ser o alvo de 680C91 e 1-MT pelo menos para as duas linhagens analisadas.

A seguir, na análise da invasão celular *in vitro* utilizamos câmaras de Boyden. Todas as formas de 1-MT, mas não 680C91, diminuíram a invasão das células da

linhagem SK-Mel 19. Em contraste, a linhagem SK-Mel 147 não exibiu alteração com nenhum dos tratamentos.

Figura 15: (A) Imagens de campos representativos das duas linhagens estudadas após invasão *in vitro* na presença de 1-MT e 680C91. Porcentagem de invasão das células das linhagens (B) SK-Mel 19 e (C) SK-Mel 147. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. O teste estatístico utilizado foi ONE Way ANOVA seguido de Tukey. ** $p < 0,01$ em relação ao controle.

Proliferação, migração e invasão são alguns dos parâmetros utilizados experimentalmente para monitorar o crescimento e habilidade metastática de células tumorais. A diminuição desses três parâmetros, por meio do tratamento com determinadas substâncias, sugerem que elas possam conter propriedades antitumorais, podendo atuar na minimização de metástases (57, 58). Os resultados apresentados neste

capítulo sugerem que todos os compostos testados possuem algum efeito direto sobre pelo menos um dos parâmetros testados em duas linhagens de melanoma, sendo claro que esse efeito varia de acordo com a linhagem. Com exceção da clonogenicidade da SK-Mel 19, não observamos nenhuma diferença significativa entre o efeito dos enantiômeros dextrógiro e levógiro, e concluímos que todos eles possuem ação direta sobre a célula tumoral que deve compor a sua atividade antineoplásica. Assim, o fator que faz o 1-*D*-MT alvo de estudo em *clinical trials* ainda não está claro. Aparentemente, este fator não envolve nenhum efeito direto sobre a proliferação, migração ou invasão tumorais, como visto neste estudo. A utilização do 1-*D*-MT poderia estar envolvida com sua farmacocinética, biodisponibilidade e segurança (61). Além disso, a atividade antitumoral deste composto pode abranger sua ação sobre células do sistema imunológico. Sabe-se que *D*-aminoácidos são usualmente tóxicos e que bactérias usam estes compostos como fonte de nitrogênio (62), além de recentemente ter sido sugerido um papel regulatório de *D*-aminoácidos em bactérias (63). Assim, esta isoforma do aminoácido poderia ser uma das maneiras de sinalização necessária para que o sistema imunológico reconheça bactérias e se ative. Tendo em vista esta hipótese, a segunda parte do nosso trabalho visa a avaliação da atividade tumoricida de células do sistema imunológico na presença do enantiômeros de 1-MT.

**CAPÍTULO 2: *Efeitos sobre a resposta imunológica, mediados
ou não pela enzima IDO.***

Sabendo-se da importante função que as células do sistema imune presentes no microambiente tumoral têm no desenvolvimento da doença, demos prosseguimento a estudos que permitissem avaliar esta atuação. Buscando atender a esta necessidade, co-culturas de células tumorais com células mononucleares do sangue periférico (PBMC's) foram realizadas. Por meio deste ensaio analisamos a resultante do contato das células tumorais com as células do sistema imune na presença de 1-MT.

Para realização destas co-culturas, inicialmente foi necessária a padronização da proporção entre os dois tipos celulares que possibilitaria a visualização de algum efeito, bem como a concentração do tratamento. Neste ensaio usamos exclusivamente a mistura racêmica de 1-MT.

(A)

Figura 16: Porcentagem de células tumorais viáveis na presença de diferentes proporções de célula tumoral e PBMC (1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:50) e diferentes concentrações de 1-DL-MT (50, 100 e 500 μ M) para SK-Mel 19 (A) e SK-Mel 147 (B). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em duplicatas. O teste estatístico utilizado foi Test T Student. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao controle (C), que possui apenas célula tumoral.

Com os resultados da padronização determinamos a melhor proporção entre as células. Buscávamos uma relação em que PBMC's sozinhas conseguissem matar as células tumorais, porcentagem observada na condição 1:50 (Melanoma:PBMC). Desse modo, as co-culturas seguintes foram realizadas com 50 células do sangue para cada célula tumoral.

Além disso, com esta padronização foi estabelecido que a concentração ideal para realizarmos as co-culturas seria 50 μ M de 1-MT, sendo que este valor é válido para as três formas estudadas do composto. Esta concentração foi escolhida, pois, procurávamos um valor onde as células tumorais, na ausência das PBMC, não morressem, já que a finalidade do ensaio de co-cultura é analisar a capacidade tumoricida de PBMC's frente ao tratamento.

Para confirmarmos a viabilidade das células tumorais nesta concentração, fizemos uma análise do ciclo celular das duas linhagens de melanomas. Incubamos estas células pelo mesmo tempo no qual as células iriam ficar em co-cultura (72 h), porém não adicionamos as PBMC's (Fig. 17).

Figura 17: Análise do ciclo celular da SK-Mel 19 (A) e SK-Mel 147 (B), na presença de 50 μ M de 1-DL-MT, 1-D-MT e 1-L-MT em meio RPMI 3% SFB por 72 horas. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em duplicatas.

Não houve alteração em nenhuma das fases do ciclo celular para estas linhagens nas condições estudadas, portanto, vimo-nos aptos a prosseguir com os experimentos. A

padronização das co-culturas e o primeiro ensaio de viabilidade apresentado aqui (contagem de células com Azul de Tripán) foram realizados em placas de 96 poços de fundo em U, pois estas favorecem o contato entre as células. Porém, a quantidade de meio de cultura utilizada nessas placas não é suficiente para a quantificação de metabólitos do Trp e de citocinas inflamatórias. Desta forma, os resultados referentes a análise do sobrenadante das co-culturas, foram originários de co-culturas em placas de 12 poços de fundo chato.

No primeiro ensaio, foram analisadas quatro grupos de condições, sendo elas: **(1)** controle, onde só haviam células tumorais; **(2)** célula tumoral mais 1-MT (1-DL-MT, 1-D-MT, 1-L-MT); **(3)** célula tumoral mais PBMC; **(4)** célula tumoral mais PBMC e 1-MT (1-DL-MT, 1-D-MT, 1-L-MT) (**Fig. 18**).

Figura 18: Esquema dos grupos de condições com as quais trabalhamos nas co-culturas realizadas em placas de 96 poços. **(1)** Tumor, **(2)** Tumor + 1-MT, **(3)** Tumor + PBMC, **(4)** Tumor + PBMC + 1-MT.

As condições 1 e 2 (**Fig.19. A; Fig.19. B**) são controles que asseguram a viabilidade das células nessas concentrações, confirmando a padronização em cada experimento realizado. As condições 3 e 4 são as co-culturas propriamente ditas, sendo que a condição 3 é o controle e a 4 são co-culturas na presença das 3 isoformas de 1-MT (**Fig.19. C; Fig.19. D**).

Figura 19: Células viáveis (contagem com Azul de Tripán) após incubação de 72 horas na ausência (**A e B**) ou presença (**C e D**) de PBMC em placa de 96 poços com fundo em U. Os tratamentos (1-DL-MT, 1-D-MT, 1-L-MT) foram utilizados à 50 μ M. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em duplicatas. O teste estatístico utilizado foi ONE Way ANOVA seguido de Tukey. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ em relação à células tumorais; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em relação à co-cultura sem 1-MT.

Para a co-cultura da linhagem SK-Mel 19, a adição de PBMC matou de cerca de 40% das células tumorais, e todas as isoformas de 1-MT acentuaram esta morte (**Fig.19. C**). Na linhagem SK-Mel 147, as células do sistema imunológico mataram em média 30% dos melanomas, sendo que apenas a mistura racêmica do 1-MT foi capaz de intensificar esta morte. Para as duas linhagens foi observado um efeito mais acentuado na presença de 1-*DL*-MT, e este efeito pode ser resultado de uma ação conjunta de 1-*D*-MT e 1-*L*-MT. O 1-*L*-MT como inibidor da enzima e o 1-*D*-MT como sinal de alerta ao sistema imune (62, 63).

Este resultado é importante na análise das co-culturas, pois ele representa melhor o contato célula-a-célula no microambiente tumoral, por isso consideramos relevante realizar esta análise. Por outro lado, como explicado anteriormente, devido a inviabilidade de análise do sobrenadante nestas condições, a partir daqui apresentamos os resultados das co-culturas em placas de 12 poços de fundo chato.

Nesse novo desenho, utilizamos apenas a SK-Mel 19, por ter sido esta linhagem a mais responsiva nas placas de 96 poços. A incubação foi de 48 horas, devido ao maior número de células utilizadas nestas placas. Além disso, aqui, consideramos quatro grupos de condições: PBMC (**Fig. 20. A**), SK-Mel 19 (**Fig. 20. B**), SK-Mel 19 + IFN- γ (**Fig. 20. C**), SK-Mel 19 + PBMC (**Fig. 20. D**), sendo que foram feitos controles para todos os grupos de condições.

Figura 20: Esquema dos grupos de condições com as quais trabalhamos nas co-culturas realizadas em placas de 12 poços. (A) PBMC, (B) SK-Mel 19, (C) SK-Mel 19 + IFN- γ , (D) SK-Mel 19 + PBMC, todos nas condições controle e presença dos três isômeros de 1-MT.

Para analisar a produção das citocinas inflamatórias, não consideramos a condição SK-Mel 19 + IFN- γ . O interferon-gama (IFN- γ) foi produzido constitutivamente pelas células tumorais e também em co-cultura, e a adição de das três formas de 1-MT fez com ela caísse significativamente nas duas condições (**Fig. 21.A.**). O fator de necrose tumoral (TNF- α) foi produzido apenas na co-cultura, sendo que nesta condição 1-MT consegue diminuir os níveis da citocina (**Fig. 21.B.**). A Interleucina-8 (IL-8) apresentou concentrações detectáveis tanto para as PBMC's em monocultura quanto para a co-cultura. Estas concentrações foram maiores para as PBMC's, e em co-cultura 1-MT foi capaz de diminui-las. Porém para as células imunes isoladamente a produção desta citocina foi aumentada tanto na presença de 1-DL-MT quanto de 1-D-MT (**Fig. 21.C.**). A Interleucina-12 (IL-12) não manteve um padrão de concentração nestas condições (**Fig. 21.D.**). Interleucina-1 beta (IL-1 β) teve uma produção baixa pelas células imunológicas isoladas, porém em co-cultura a concentração desta citocina

aumentou e nenhuma das formas de 1-MT alterou-a (**Fig. 21.E.**). A Interleucina-6 (IL-6) foi produzida pelas PBMC's isoladamente e quando adicionamos 1-DL-MT e 1-D-MT a concentração da citocina diminuiu. Em co-cultura, a produção de IL-6 foi maior, porém não houve alteração na presença de nenhuma das formas de 1-MT (**Fig. 21.F.**). A Interleucina-10 (IL-10) apresentou uma baixa produção nas condições de monocultura (SK-Mel 19 e PBMC), porém em co-cultura sua concentração foi maior, sendo que na presença de 1-MT esta produção se elevou ainda mais (**Fig. 21.G.**).

(A)

(B)

(C)

(D)

Figura 21: Quantificação de citocinas pro-inflamatórias, IFN- γ (A), TNF- α (B), IL-6 (C), IL-1 β (D), IL-12 (E), IL-8 (F) e da citocina anti-inflamatória, IL-10 (G) no sobrenadante da co-cultura, da célula tumoral e do PBMC isoladamente na presença de 1-MT. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de uma triplicata. O teste estatístico utilizado foi ONE Way ANOVA seguido de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle de cada condição.

Nossa discussão será restrita aos resultados de IFN- γ , TNF- α e IL-10, uma vez que para estas citocinas tivemos efeitos mais consistentes da adição de 1-MT, além de estas serem citocinas muito importantes no processo tumoral. Os resultados dos efeitos de 1-MT inibindo a produção de IFN- γ e de TNF- α e estimulando IL-10 pareceram-nos surpreendente. Do nosso conhecimento esta informação é nova e não há relato anterior desta ação.

Apesar de ser conhecido que células do sistema imunológico desencadeiam seus efeitos citotóxicos também através da produção de citocinas, principalmente pela ação das citocinas tumoricidas IFN- γ e TNF- α (64), sabe-se que estas mesmas citocinas levam a efeitos que podem ser pró-tumorais. Ou seja, IFN- γ e TNF- α possuem efeitos duais (65). Além da ação de IFN- γ como indutora de IDO, que possui atividade imunossupressora, foi descrito que TNF- α diminui a capacidade de reconhecimento das células tumorais pelas células T (66). Posto isto, nossos resultados, mostram que 1-MT pode alterar a concentração destas citocinas, e esta alteração deve ter impacto sobre o crescimento tumoral. Apesar de não sabermos de forma definitiva qual será a resposta do tumor frente a estas alterações das citocinas, é possível que parte dos efeitos antitumorais da 1-MT seja consequência de sua ação sobre elas.

IL-10 é caracterizada como uma citocina anti-inflamatória que inibe a resposta imune (67). Porém existem relatos conflitantes a respeito desta citocina. Um trabalho publicado em 2004 mostra que IL-10 aumenta a expressão de genes relacionados à citotoxicidade e a ativação de células NK (68). Outro trabalho, publicado em janeiro deste ano, mostrou que IL-10 não afeta a capacidade funcional de células do sistema imune, e células dendríticas maduras co-cultivadas com células de melanoma produziram um aumento de IL-10 e induziram a proliferação de células T (69). Posto isso, além da função imunossupressora, IL-10 pode contribuir para a resposta imune inata. Nossos resultados mostraram um aumento de IL-10 com a adição de 1-MT em co-cultura e é possível, como discutido no parágrafo acima para IFN- γ e TNF- α , que esta alteração possa ter impacto sobre o crescimento tumoral.

A seguir, a quantificação dos metabólitos de Trp foi realizada nas quatro condições esquematizadas na Figura 17. Triptofano foi consumido do meio de cultura pelas células tumorais ($p < 0,001$) e pelas PBMC's ($p < 0,05$) em monocultura, e como

esperado a adição de 1-MT inibiu este consumo ($p>0,05$). A co-cultura propriamente dita (SK-Mel 19 + PBMC) mimetizou o que acontece quando adicionamos IFN- γ (SK-Mel 19 + IFN- γ), sendo que todo o Trp foi consumido nos controles e este consumo foi levemente inibido após adição de 1-MT. Com exceção do 1-DL-MT em co-cultura, que foi menos eficaz na inibição do consumo do Trp (**Fig. 22. A**).

A produção de QUIN foi bem discreta para a célula SK-Mel 19 em monocultura, sendo que a adição de 1-MT nesta condição não causou alterações. Nas PBMC's, apesar da produção deste metabólito não ter sido muito elevada, a adição de todas as isoformas de 1-MT foi capaz de inibi-la. Assim como observado para o Trp, as co-culturas propriamente ditas mimetizaram o que acontece com IFN- γ , sendo que 1-MT não inibiu a produção de quinurenina em nenhuma das duas condições (**Fig. 22. B**).

(A)

Figura 22: Concentração de Trp (A) e QUIN (B) no sobrenadante da co-cultura e também da célula tumoral isolada e na presença de IFN- γ , e do PBMC isoladamente após incubação de 48 horas na presença de 1-MT. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de uma triplicata. A linha em vermelho representa a concentração do analito no meio de cultura. O teste estatístico utilizado foi ONE Way ANOVA seguido de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle de cada condição.

Como podemos observar, houve consumo do triptofano do meio de cultura pelas células tumorais isoladamente, porém este consumo não foi eficiente para ser refletido na produção de QUIN (**Fig. 22**). Trp, além de produzir QUIN, é utilizado para síntese protéica. Apesar de termos visto que SK-Mel 19 apresenta uma produção basal de IFN- γ (400 pg/mL; **Fig. 21. A.**), esta concentração é muito menor do que a necessária para a indução de IDO (70). Por outro lado PBMC produz QUIN e fica clara a inibição de IDO pelos diferentes enantiômeros do 1-MT. De qualquer forma na co-cultura a produção de QUIN é muito superior e os inibidores não foram capazes de modificar sua concentração.

A seguir serão apresentados os resultados dos efeitos de 1-MT sobre os metabólitos que dão sequência a via das quinureninas em co-culturas. Os analitos passíveis de serem quantificados foram ácido antranílico (AA), ácido quinurênico (KA), ácido xanturênico (XA), ácido quinolínico (QA), ácido nicotínico (NA). Os compostos: nicotinamida (NAM), 3-hidróxi-antranílico (HAA), ácido picolínico (PA), 2-amino-3-carboximuconato semialdeído (ACS) e 3-hidróxi-quinurenina (HK) não estavam presentes em quantidades mensuráveis.

SK-Mel 19 isolada não produz ácido antranílico (AA), tanto na condição controle, quanto na presença de 1-MT. AA foi produzido pelo PBMC, mas após adição de 1-MT essa produção foi inibida. SK-Mel 19 na presença de IFN- γ mostra uma produção similar a do PBMC, que é aumentada apenas por 1-*D*-MT, e inibida pela mistura racêmica e por 1-*L*-MT. Em co-cultura, vimos uma produção irregular de AA, sendo que esta não sofreu alteração na presença de 1-MT. Para este metabólito, todas as condições seguiram o padrão de sequência da rota esperado (**Fig. 23. A**).

SK-Mel 19 não modificou significativamente a concentração de ácido quinurênico (KA) do meio de cultura em nenhuma das condições ($p > 0,05$), porém quando comparado ao controle, esta concentração é levemente menor na presença de 1-*D*-MT e 1-*L*-MT. PBMC também manteve a concentração de KA do meio de cultura. Após adição de IFN- γ , SK-Mel 19 aumentou sua produção deste metabólito, sendo que esta foi mais significativa na presença de 1-*DL*-MT. Em co-cultura, foi observada o aumento da produção de KA quando comparado a todas as outras condições controle ($p < 0,01$). Esta concentração se manteve na presença de todas isoformas de 1-MT (**Fig. 23. B**).

Ácido xanturênico (XA) foi consumido pela célula tumoral isolada, porém 1-MT inibiu este consumo ($p < 0,05$). PBMC, tanto na presença de 1-MT quanto no controle manteve as concentrações de XA do meio de cultura. Na presença apenas de IFN- γ , SK-Mel 19 foi capaz de esgotar o XA do meio de cultura, porém 1-MT inibiu discretamente este consumo. Em co-cultura, 1-MT não teve efeito sobre o consumo deste metabólito e suas concentrações se mantiveram semelhantes aos da condição SK-Mel 19 + IFN- γ na presença de 1-MT (**Fig. 23. C**).

SK-Mel 19 em monocultura e também na presença de IFN- γ mantiveram a concentração de ácido quinolínico (QA) do meio de cultura, 1-MT não alterou estas condições. PBMC em monocultura e a co-cultura produziram QA em todas as condições ($p > 0,05$) e 1-MT não modificou esta produção (**Fig. 23. D**).

Ácido nicotínico (NA) foi produzido pela SK-Mel 19 apenas na presença de 1-*DL*-MT ($p < 0,001$). O PBMC no controle e com 1-MT consumiu este metabólito em igual proporção. Na presença de IFN- γ , controle e células tratadas com 1-MT mantiveram suas concentrações próximas à concentração do meio de cultura, sendo que 1-MT induziu o consumo quando comparado ao controle. Em co-cultura, todas as condições geraram consumo de NA ($p < 0,05$) (**Fig. 23. E**).

(A)

(B)

Figura 23: Concentração dos metabólitos da via QUIN (AA (A), KA (B), XA (C), QA (D), NA (E)) no sobrenadante da co-cultura, da célula tumoral isolada e na presença de IFN- γ , e do PBMC isoladamente após incubação de 48 horas na presença de 1-MT. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de uma triplicata. A linha em vermelho representa a concentração da analito no meio de cultura. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Alguns analitos mesmo mensuráveis estão em concentrações próximas ao limite de detecção e quantificação, como é o caso do KA. Segundo o método de quantificação validado pela aluna de Doutorado Ariane Rivellis Júlio, o KA possui limite de detecção igual a 0,005 μ M valor muito próximo à concentração encontrada nas condições onde SK-Mel 19 e PBMC estão isoladas. Outros metabólitos que possuem limites de detecção próximos as concentrações encontradas nestes resultados são 5-HT (0,002 μ M) e IAA (0,02 μ M). Apesar destes valores baixos, os metabólitos em questão seguem um padrão em relação a concentração de QUIN.

Como AA não foi produzido pela célula tumoral isolada e tendo aparecido tanto na presença de IFN- γ quanto no PBMC, é tentador sugerir que a produção deste

metabólito seja induzida por IFN- γ , já que foi mostrado que o contato entre célula tumoral e célula imune induz a produção desta citocina (Fig. 19.A). Porém, vale ressaltar que ainda não foi identificado o papel de AA no processo tumoral. Além disso, nossos resultados mostram que 1-MT inibe a síntese de AA e que esta inibição apresenta estereoespecificidade, uma vez que somente o 1-*L*-MT teve efeito (**Fig 23.B**).

É interessante notar que a co-cultura por si só leva a modificações alguns metabólitos da via das quinureninas. Sendo que nesta condição tem-se um aumento no consumo de XA e uma diminuição na produção de KA. Esse resultado parece significativo para a imunologia de tumores, pois o XA tem ação anti-inflamatória (71) e KA também é um metabólito imunossupressor (72).

O consumo de NA e a produção de QA pela co-cultura possivelmente deve-se a metabolização destes compostos pelas PBMC's, uma vez que não houveram diferenças estatísticas entre estas condições. NA é precursor de NAD⁺ (5, 6), portanto as células imunológicas podem ter usado este metabólito para produção de energia, e devido ao número de PBMC's ser 50 vezes maior que o número de células tumorais, não foi possível observar este consumo para a SK-Mel 19. Já foi reportada a síntese de QA por macrófago (73) e por células da micróglia (74). Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que células mononucleares, podem também sintetizar este metabólito da via QUIN.

Quanto aos metabólitos de Trp oriundos de outras vias, nossas condições permitiram quantificar apenas serotonina (5-HT) (via SER/MLT) e ácido indolacético (IAA) (via das TRY). A serotonina foi consumida pelo PBMC e pela co-cultura, porém SK-Mel 19 foi capaz de produzi-la tanto na ausência quanto na presença de IFN- γ . A mistura racêmica e o enantiômero levógiro de 1-MT foram capazes de inibir a produção

É sabido que IAA é bem tolerado em humanos e que apenas seus produtos de oxidação apresentariam toxicidade tumor (75). Pelos nossos resultados não observamos nenhuma situação que evidenciasse alguma ação tóxica do IAA ou de seus possíveis produtos de oxidação. Serotonina possui vários efeitos na modulação do sistema imune, tais como indução de inflamação, fagocitose, migração de células T e produção de citocinas (76-78). Nos nossos ensaios vimos um aumento do consumo deste metabólito na co-cultura, que pode ser resultado da utilização pelas PBMC's, pois a célula tumoral não consumiu 5-HT em nenhuma outra condição aqui estudada, pelo contrário, ela aumenta esta produção. Assim, sugerimos que a 5-HT consumida pelas PBMC's pode ser usada na imunomodulação.

5. CONCLUSÕES

Esse trabalho contribui para mostrar alguns dos efeitos de 1-MT que devem acontecer *in vivo* compondo parte de sua atividade antitumoral. Alterações na proliferação e invasão de duas linhagens de melanomas foram mostradas, sugerindo que todos os compostos testados possuem pelo menos algum efeito direto sobre estes parâmetros, sendo claro que esse efeito pode variar de acordo com a linhagem.

Além disso, nossos resultados chamam atenção para o efeito de 1-MT sobre a produção de citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-10, sendo possível que parte dos efeitos antitumorais dessa substância seja consequência de sua ação sobre elas. Alterações em compostos das três vias de metabolização do Trp também merecem destaque neste trabalho, mostrando que não só o eixo Trp-QUIN tem atuação no microambiente tumoral. Ainda devemos ressaltar que a co-cultura por si só leva a modificações em alguns metabólitos da via QUIN, indicando que estes merecem ser mais explorados em estudos da imunologia do câncer.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Peters JC. TRYPTOPHAN NUTRITION AND METABOLISM - AN OVERVIEW. Kynurenine and Serotonin Pathways : Progress in Tryptophan Research. 1991;294:345-58.
2. King NJC, Thomas SR. Molecules in focus: Indoleamine 2,3-dioxygenase. International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2007;39(12):2167-72.
3. Opitz C, Wick W, Steinman L, Platten M. Tryptophan degradation in autoimmune diseases. Cell Mol Life Sci. 2007;64(19-20):2542-63.
4. Gobaille S, Kemmel V, Brumaru D, Dugave C, Aunis D, Maitre M. Xanthurenic acid distribution, transport, accumulation and release in the rat brain. J Neurochem. 2008;105(3):982-93.
5. Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. Immunology and Cell Biology. 2003;81(4):247-65.
6. Keszthelyi D, Troost FJ, Masclee AAM. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. Neurogastroenterology and Motility. 2009;21(12):1239-49.
7. Nordlind K, Azmitia E, Slominski A. The skin as a mirror of the soul: exploring the possible roles of serotonin. Exp Dermatol. 2008;17(4):301-11.
8. Xiang Z, Hrabetova S, Moskowitz S, Casaccia-Bonnet P, Young S, Nimmrich V, et al. Long-term maintenance of mature hippocampal slices in vitro. J Neurosci Methods. 2000;98(2):145-54.
9. Squires L, Jakubowski J, Stuart J, Rubakhin S, Hatcher N, Kim W, et al. Serotonin catabolism and the formation and fate of 5-hydroxyindole thiazolidine carboxylic acid. J Biol Chem. 2006;281(19):13463-70.

10. Keszthelyi D, Troost F, Masclee A. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterol Motil.* 2009;21(12):1239-49.
11. Tekes K. HPLC determination of serotonin and its metabolites from human platelet-rich plasma; shift to 5-hydroxytryptophol formation following alcohol consumption. *J Chromatogr Sci.* 2008;46(2):169-73.
12. LERNER A, CASE J, MORI W, WRIGHT M. Melatonin in peripheral nerve. *Nature.* 1959;183:1821.
13. Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia.* 1989;45(10):922-32.
14. Tan D, Hardeland R, Manchester L, Poeggeler B, Lopez-Burillo S, Mayo J, et al. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *J Pineal Res.* 2003;34(4):249-59.
15. Silva S, Ximenes V, Livramento J, Catalani L, Campa A. High concentrations of the melatonin metabolite, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, in cerebrospinal fluid of patients with meningitis: a possible immunomodulatory mechanism. *J Pineal Res.* 2005;39(3):302-6.
16. Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T, Seno S. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem.* 1974;249(4):1311-3.
17. Katz JB, Muller AJ, Prendergast GC. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunological Reviews.* 2008;222:206-21.
18. Moreno ACR, Clara RO, Coimbra JB, Julio AR, Albuquerque RC, Oliveira EM, et al. The expanding roles of 1-methyl-tryptophan (1-MT): in addition to inhibiting kynurenine production, 1-MT activates the synthesis of melatonin in skin cells. *Febs Journal.* 2013;280(19):4782-92.

19. Tourino MC, de Oliveira EM, Belle LP, Knebel FH, Albuquerque RC, Doerr FA, et al. Tryptamine and dimethyltryptamine inhibit indoleamine 2,3 dioxygenase and increase the tumor-reactive effect of peripheral blood mononuclear cells. *Cell Biochemistry and Function*. 2013;31(5):361-4.
20. Fatokun AA, Hunt NH, Ball HJ. Indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (IDO2) and the kynurenine pathway: characteristics and potential roles in health and disease. *Amino Acids*. 2013;45(6):1319-29.
21. Loeb S, Koenigsrainer A, Zieker D, Bruecher BLDM, Rammensee H-G, Opelz G, et al. IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2009;58(1):153-7.
22. Zamanakou M, Germenis AE, Karanikas V. Tumor immune escape mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunology Letters*. 2007;111(2):69-75.
23. Prendergast GC, Metz R, Muller AJ. IDO recruits Tregs in melanoma. *Cell Cycle*. 2009;8(12):1818-9.
24. Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(5):1147-54.
25. Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB, et al. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science*. 2002;297(5588):1867-70.
26. Opitz CA, Litzenburger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S, et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2011;478(7368):197-203.

27. Pantouris G, Mowat CG. Antitumour agents as inhibitors of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014;443(1):28-31.
28. Esser C. Biology and function of the aryl hydrocarbon receptor: report of an international and interdisciplinary conference. *Archives of Toxicology*. 2012;86(8):1323-9.
29. Pilotte L, Larrieu P, Stroobant V, Colau D, Dolusic E, Frederick R, et al. Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(7):2497-502.
30. Langman RE, Cohn M. A minimal model for the self-nonsel self discrimination: a return to the basics. *Seminars in Immunology*. 2000;12(3):189-95.
31. Vesely MD, Schreiber RD. Cancer immunoediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy. *Renaissance of Cancer Immunotherapy*. 2013;1284:1-5.
32. Prendergast GC. CANCER Why tumours eat tryptophan. *Nature*. 2011;478(7368):192-4.
33. Mukherji B. Immunology of melanoma. *Clinics in Dermatology*. 2013;31(2):156-65.
34. Shimanovsky A, Jethava A, Dasanu CA. Immune alterations in malignant melanoma and current immunotherapy concepts. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2013;13(10):1413-27.
35. Terme M, Chaput N, Combadiere B, Ma A, Ohteki T, Zitvogel L. Regulatory T cells control dendritic cell/NK cell cross-talk in lymph nodes at the steady state by inhibiting CD4(+) self-reactive T cells. *Journal of Immunology*. 2008;180(7):4679-86.

36. Poggi A, Musso A, Dapino I, Zocchi MR. Mechanisms of tumor escape from immune system: Role of mesenchymal stromal cells. *Immunology Letters*. 2014;159(1-2):55-72.
37. Capece L, Lewis-Ballester A, Yeh SR, Estrin DA, Marti MA. Complete Reaction Mechanism of Indoleamine 2,3-Dioxygenase as Revealed by QM/MM Simulations. *Journal of Physical Chemistry B*. 2012;116(4):1401-13.
38. Tatsumi K, Higuchi T, Fujiwara H, Nakayama T, Egawa H, Itoh K, et al. Induction of tryptophan 2,3-dioxygenase in the mouse endometrium during implantation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;274(1):166-70.
39. Thackray SJ, Mowat CG, Chapman SK. Exploring the mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochemical Society Transactions*. 2008;36:1120-3.
40. Dang YH, Dale WE, Brown OR. Comparative effects of oxygen on indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase of the kynurenine pathway. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000;28(4):615-24.
41. Yuasa HJ, Ball HJ, Austin CJD, Hunt NH. 1-L-methyltryptophan is a more effective inhibitor of vertebrate IDO2 enzymes than 1-D-methyltryptophan. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. 2010;157(1):10-5.
42. Cady SG, Sono M. 1-METHYL-DL-TRYPTOPHAN, BETA-(3-BENZOFURANYL)-DL-ALANINE (THE OXYGEN ANALOG OF TRYPTOPHAN), AND BETA- 3-BENZO(B)THIENYL -DL-ALANINE (THE SULFUR ANALOG OF TRYPTOPHAN) ARE COMPETITIVE INHIBITORS FOR INDOLEAMINE 2,3-DIOXYGENASE. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1991;291(2):326-33.

43. Loeb S, Koenigsrainer A. Is IDO a key enzyme bridging the gap between tumor escape and tolerance induction? *Langenbecks Archives of Surgery*. 2008;393(6):995-1003.
44. Opitz CA, Litzenburger UM, Opitz U, Sahm F, Ochs K, Lutz C, et al. The Indoleamine-2,3-Dioxygenase (IDO) Inhibitor 1-Methyl-D-tryptophan Upregulates IDO1 in Human Cancer Cells. *Plos One*. 2011;6(5):11.
45. Sarkhosh K, Tredget EE, Uludag H, Kilani RT, Karami A, Li YY, et al. Temperature-sensitive polymer-conjugated IFN-gamma induces the expression of IDO mRNA and activity by fibroblasts populated in collagen gel (FPCG). *Journal of Cellular Physiology*. 2004;201(1):146-54.
46. Rutella S, Bonanno G, Procoli A, Mariott A, de Ritis DG, Curti A, et al. Hepatocyte growth factor favors monocyte differentiation into regulatory interleukin (IL)-10++IL-12(low/neg) accessory cells with dendritic-cell features. *Blood*. 2006;108(1):218-27.
47. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: Tolerance and tryptophan catabolism. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4(10):762-74.
48. Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nature Medicine*. 2003;9(10):1269-74.
49. Hou D-Y, Muller AJ, Sharma MD, DuHadaway J, Banerjee T, Johnson M, et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer Research*. 2007;67(2):792-801.
50. Metz R, DuHadaway JB, Kamasani U, Laury-Kleintop L, Muller AJ, Prendergast GC. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical

target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Research*. 2007;67(15):7082-7.

51. Munn D, Mellor A, inventors; MEDICAL COLLEGE GEORGIA RES INST (MEDI-Non-standard) GEORGIA REGENTS RES INST INC (GEOR-Non-standard), assignee. Use of indoleamine-2,3-dioxygenase inhibitors (e.g. 1-methyl-tryptophan) and at least one additional therapeutic agent (e.g. cyclophosphamide) for treatment of cancers or viral, bacterial or parasite infections patent US2004234623-A1; US7598287-B2; US8580844-B2. US2004234623-A1 25 Nov 2004 A61N-005/00 200482 Pages: 42 English US7598287-B2 06 Oct 2009 A61K-031/40 200966 English US8580844-B2 12 Nov 2013 A61K-031/40 201375 English.

52. Jia L, Schweikart K, Tomaszewski J, Page JG, Noker PE, Buhrow SA, et al. Toxicology and pharmacokinetics of 1-methyl-D-tryptophan: Absence of toxicity due to saturating absorption. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46(1):203-11.

53. Salter M, Hazelwood R, Pogson CI, Iyer R, Madge DJ. THE EFFECTS OF A NOVEL AND SELECTIVE INHIBITOR OF TRYPTOPHAN 2,3-DIOXYGENASE ON TRYPTOPHAN AND SEROTONIN METABOLISM IN THE RAT. *Biochemical Pharmacology*. 1995;49(10):1435-42.

54. Sedlmayr P. The role of placental tryptophan catabolism. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2013;70:12-.

55. Agaugue S, Perrin-Cocon L, Coutant F, Andre P, Lotteau V. 1-methyl-tryptophan can interfere with TLR signaling in dendritic cells independently of IDO activity. *Journal of Immunology*. 2006;177(4):2061-71.

56. Tormo D, Checinska A, Alonso-Curbelo D, Perez-Guijarro E, Canon E, Riveiro-Falkenbach E, et al. Targeted Activation of Innate Immunity for Therapeutic Induction of Autophagy and Apoptosis in Melanoma Cells. *Cancer Cell*. 2009;16(2):103-14.

57. Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschlaeger M, et al. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*. 2013;752(1):10-24.
58. Decaestecker C, Debeir O, Van Ham P, Kiss R. Can anti-migratory drugs be screened in vitro? A review of 2D and 3D assays for the quantitative analysis of cell migration. *Medicinal Research Reviews*. 2007;27(2):149-76.
59. Liu Y, Wu H-W, Sheard MA, Sposto R, Somanchi SS, Cooper LJN, et al. Growth and Activation of Natural Killer Cells Ex Vivo from Children with Neuroblastoma for Adoptive Cell Therapy. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(8):2132-43.
60. Schmidt SK, Siepmann S, Kuhlmann K, Meyer HE, Metzger S, Pudelko S, et al. Influence of Tryptophan Contained in 1-Methyl-Tryptophan on Antimicrobial and Immunoregulatory Functions of Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Plos One*. 2012;7(9).
61. Sainio EL, Pulkki K, Young SN. L-tryptophan: Biochemical, nutritional and pharmacological aspects. *Amino Acids*. 1996;10(1):21-47.
62. Zhang G, Sun HJ. Racemization in Reverse: Evidence that D-Amino Acid Toxicity on Earth Is Controlled by Bacteria with Racemases. *Plos One*. 2014;9(3).
63. Cava F, Lam H, de Pedro MA, Waldor MK. Emerging knowledge of regulatory roles of d-amino acids in bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011;68(5):817-31.
64. Braumueller H, Wieder T, Brenner E, Assmann S, Hahn M, Alkhaled M, et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*. 2013;494(7437):361-5.
65. Zaidi MR, Merlino G. The Two Faces of Interferon-gamma in Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(19):6118-24.

66. Landsberg J, Kohlmeyer J, Renn M, Bald T, Rogava M, Cron M, et al. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature*. 2012;490(7420):412-+.
67. Striz I, Brabcova E, Kolesar L, Sekerkova A. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clinical Science*. 2014;126(9-10):593-612.
68. Mocellin S, Panelli M, Wang E, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, et al. IL-10 stimulatory effects on human NK cells explored by gene profile analysis. *Genes and Immunity*. 2004;5(8):621-30.
69. Wiguna AP, Walden P. Role of IL-10 and TGF-beta in melanoma. *Experimental Dermatology*. 2015;24(3):209-14.
70. Ozaki Y, Edelstein MP, Duch DS. INDUCTION OF INDOLEAMINE 2,3-DIOXYGENASE - A MECHANISM OF THE ANTITUMOR-ACTIVITY OF INTERFERON-GAMMA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(4):1242-6.
71. Nurcombe HL, Bucknall RC, Edwards SW. NEUTROPHILS ISOLATED FROM THE SYNOVIAL-FLUID OF PATIENTS WITH RHEUMATOID-ARTHRITIS - PRIMING AND ACTIVATION INVIVO. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1991;50(3):147-53.
72. Sagan D, Kocki T, Kocki J, Szumilo J. Serum Kynurenic Acid: Possible Association with Invasiveness of Non-small Cell Lung Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012;13(9):4241-4.
73. Heyes MP, Saito K, Markey SP. HUMAN MACROPHAGES CONVERT L-TRYPTOPHAN INTO THE NEUROTOXIN QUINOLINIC ACID. *Biochemical Journal*. 1992;283:633-5.

74. Heyes MP, Achim CL, Wiley CA, Major EO, Saito K, Markey SP. Human microglia convert L-tryptophan into the neurotoxin quinolinic acid. *Biochemical Journal*. 1996;320:595-7.
75. Folkes LK, Wardman P. Oxidative activation of indole-3-acetic acids to cytotoxic species - a potential new role for plant auxins in cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*. 2001;61(2):129-36.
76. Laberge S, Cruikshank WW, Beer DJ, Center DM. Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8(+) T cells in vitro. *Journal of Immunology*. 1996;156(1):310-5.
77. Cloez-Tayarani I, Petit-Bertron AF, Venters HD, Cavaillon JM. Differential effect of serotonin on cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells: involvement of 5-hydroxytryptamine(2A) receptors. *International Immunology*. 2003;15(2):233-40.
78. Nakamura K, Sato T, Ohashi A, Tsurui H, Hasegawa H. Role of a serotonin precursor in development of gut microvilli. *American Journal of Pathology*. 2008;172(2):333-44.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

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

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

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

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

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

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

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

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

São Paulo, 23 de maio de 2014.

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

Maryana Stephany Ferreira Branquinho

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2468990281614444>

Última atualização do currículo em 16/06/2015

Possui graduação em Farmácia pela Universidade Federal de Alfenas (2012). Atualmente é mestranda em Farmácia (Área Análises Clínicas) na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Maryana Stephany Ferreira Branquinho
Nome em citações bibliográficas BRANQUINHO, M. S. F.

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2013 Mestrado em andamento em Farmácia (Análises Clínicas) (Conceito CAPES 7).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Efeitos dos inibidores de IDO e TDO na proliferação, migração e invasão de melanomas humanos e na atividade tumoricida de células mononucleares., Orientador: Ana Campa.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

2007 - 2012 Graduação em Farmácia.
Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Brasil.
Título: Avaliação do efeito do extrato de partes aéreas de Baccharis Dracunculifolia sobre a função renal em ratos diabéticos.
Orientador: Fernanda Borges de Araújo Paula.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2013 - Atual Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Mestrando, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: , Enquadramento Funcional:

Laboratório Central de Análises Clínicas, LACEN, Brasil.

Vínculo institucional

2012 - 2012 Vínculo: Voluntário, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 40

Laboratório Municipal Dr. Alfredo Barbalho Cavalcante, L.M.A.B.C, Brasil.**Vínculo institucional****2008 - 2008**

Vínculo: Voluntário, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 20

CJL Drogarias LTDA, CJL, Brasil.**Vínculo institucional****2012 - 2013**

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Farmacêutica Responsável

Município de Alfenas, ALFENAS, Brasil.**Vínculo institucional****2010 - 2010**

Vínculo: Voluntário, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 4

Pharmacêutica Manipulação, PHARMACÊTICA, Brasil.**Vínculo institucional****2011 - 2011**

Vínculo: Voluntário, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 40

Drogaria Rabelo e Peloso LTDA, DROG. RP, Brasil.**Vínculo institucional****2010 - 2010**

Vínculo: Voluntário, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 30

Projetos de extensão

2008 - 2008

Ler: uma eterna aventura

Descrição: Vinculado ao Programa "Atenção à Saúde da Criança e Adolescente", onde incentivávamos a leitura de crianças de creches e orfanatos da cidade de Alfenas-MG..

Situação: Concluído; Natureza: Extensão.

Alunos envolvidos: Graduação: (25) .

Integrantes: Maryana Stephany Ferreira Branquinho - Integrante / Dênis da Silva Moreira - Coordenador.

Áreas de atuação

1.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia.

Idiomas

Inglês

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Espanhol

Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Prêmios e títulos

2014

Melhor pôster de mestrado apresentado na XIX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêutica da USP, Faculdade de Ciências Farmacêutica da USP.

Bancas

Participação em bancas de comissões julgadoras

Outras participações

1. **BRANQUINHO, M. S. F.**. 22º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - SIICUSP. 2014. Universidade de São Paulo.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. XIX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia.Efeitos dos inibidores de IDO e TDO na proliferação, migração e invasão de melanomas humanos e na atividade tumoricida de células mononucleares. 2014. (Seminário).
2. Hematologia: principais causas de erro do hemograma e automação..Hematologia: principais causas de erro do hemograma e automação.. 2011. (Outra).
3. Curso: Análise Forense.Análise Forense. 2011. (Outra).
4. Campanha pelo uso racional de medicamentos.Campanha pelo uso racional de medicamentos. 2010. (Oficina).
5. 44ª Semana Farmacêutica da UNIFAL-MG.44ª Semana Farmacêutica da UNIFAL-MG. 2010. (Encontro).
6. "Pró-saúde: Reformulando a Saúde Pública"."Ao povo o que é do povo... Pró-saúde: Reformulando a Saúde Pública". 2008. (Seminário).
7. Programa de Treinamento de Estagiários.Programa de Treinamento de Estagiários. 2008. (Outra).
8. Programa de Treinamento de Estagiários.Programa de Treinamento de Estagiários. 2008. (Outra).
9. Biossegurança: a importância da imunização para o trabalhador de saúde..Biossegurança: a importância da imunização para o trabalhador de saúde.. 2008. (Outra).
10. 42ª Semana Farmacêutica da UNIFAL-MG.42ª Semana Farmacêutica da UNIFAL-MG. 2007. (Encontro).
11. Minicurso: Descarte de resíduos de serviço de saúde.Descarte de resíduos de serviço de saúde. 2007. (Outra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. ★ **BRANQUINHO, M. S. F.** . 44ª Semana Farmacêutica da UNIFAL-MG. 2010. (Outro).

Outras informações relevantes

Monitorias durante a graduação: Monitoria da disciplina de Bioquímica Clínica, no curso de Farmácia, durante o primeiro semestre de 2012 totalizando 90 horas, Departamento de Análises Clínicas - UNIFAL MG, professor responsável Fernanda Borges de Araújo Paula.

Monitoria da Disciplina de Controle Microbiológico de Alimentos, Cosméticos e Medicamentos no curso de Farmácia, durante o segundo semestre de 2011 totalizando 90 horas, Departamento de Alimentos e Medicamentos - UNIFAL MG, professor responsável Sandra Maria Oliveira Moraes Veiga. Monitoria da Disciplina de Farmácia Hospitalar no curso de Farmácia, durante o primeiro semestre de 2011 totalizando 90 horas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNIFAL MG, professor responsável Walneia Aparecida de Souza. Cursos de curta duração e mesa-redonda: Participação no minicurso: Farmácia, um estabelecimento de saúde. Com carga horária de 2 horas, realizada no dia 03 de setembro de 2009. Participação na mesa-redonda: Pós-graduação. Com carga horária de 4 horas, realizada durante a "44ª Semana Farmacêutica".

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 28/08/2015 às 13:34:38

[Imprimir currículo](#)

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

9136 - 8442874/1 - Maryana Stephany Ferreira Branquinho

Email: maryanabranquinho@usp.br
Data de Nascimento: 08/12/1988
Cédula de Identidade: RG - MG. 15.448.034 - MG
Local de Nascimento: Estado de Minas Gerais
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutica - Universidade Federal de Alfenas - Minas Gerais - Brasil - 2012

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Análises Clínicas)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 16/07/2013
Início da Contagem de Prazo: 16/07/2013
Data Limite para o Depósito: 18/01/2016
Orientador: Prof(a). Dr(a). Ana Campa - 16/07/2013 até o presente. Email: anacampa@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 16/07/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 11/08/2014
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 16/07/2013

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 20/07/2015

Impresso em: 28/08/2015 13:38:18

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

9136 - 8442874/1 - Maryana Stephany Ferreira Branquinho

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5753-3/1	Processos de Invasão Celular	05/08/2013	15/09/2013	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5757-4/2	Tópicos em Análises Clínicas II	06/08/2013	18/11/2013	15	1	87	A	N	Concluída
EDM5791-5/11	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/08/2013	29/11/2013	120	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
MCM5891-1/5	Estatística Instrumental (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	07/10/2013	03/11/2013	60	4	93	B	N	Concluída
FBC5780-2/2	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	10/03/2014	20/04/2014	90	6	94	A	N	Concluída
FBC5793-12/1	Tópicos em Análises Clínicas I	11/03/2014	23/06/2014	15	1	80	A	N	Concluída
FBC5748-4/1	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	08/04/2014	19/05/2014	60	4	91	A	N	Concluída
FBA5728-3/10	Aprimoramento Didático	19/08/2014	15/09/2014	60	4	88	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	26
Estágios:			
Total:	0	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 20/07/2015

Impresso em: 28/08/2015 13:38:19

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

9136 - 8442874/1 - Maryana Stephany Ferreira Branquinho

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 20/07/2015

Impresso em: 28/08/2015 13:38:19