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

# Efeitos da luz sobre o metabolismo de triptofano em melanócitos e melanomas

**MAYSA BRAGA BARROS SILVA**

**Orientadora: Profa. Titular Ana Campa**

**São Paulo**
**2017**

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

# Efeitos da luz sobre o metabolismo de triptofano em melanócitos e melanomas

**MAYSA BRAGA BARROS SILVA**

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**

**Orientadora: Profa. Titular Ana Campa**

**São Paulo**
**2017**

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

Silva, Maysa Braga Barros
S586e Efeitos da luz sobre o metabolismo de triptofano em melanócitos e melanomas / Maysa Braga Barros Silva. -- São Paulo, 2017.
86p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Campa, Ana

1. Bioquímica clínica I. T. II. Campa, Ana, orientador.

616.0756 CDD

Maysa Braga Barros Silva

Efeitos da luz sobre o metabolismo de triptofano em melanócitos e melanomas

Comissão Julgadora da dissertação para obtenção do título de MESTRE

_____

Profa. Tit. Ana Campa

Orientadora/Presidente

_____

1°. examinador

_____

2°. examinador

_____

3°. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2017.

*“A persistência é o menor caminho do êxito”.*

Charles Chaplin

## Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha mãe, por estar ao meu lado, me apoiando e incentivando durante toda a trajetória para essa conquista.

**Agradecimentos**

Primeiramente agradeço a Deus, por tornar essa vitória possível e por ser minha fonte de forças todos os dias.

Agradeço a minha mãe por me apoiar e por não medir esforços para me ajudar em tudo e ao meu padastro, André, por sempre me incentivar a seguir em frente pelo caminho que escolhi, por todas as vezes que me levou no ponto quando precisei chegar cedo na USP e pelas marmitas também rs. Não existem palavras capazes de expressar a minha gratidão a vocês.

Agradeço a minha orientadora, Ana Campa, pela dedicação, paciência, confiança e incentivo durante esses anos. Pelas observações que só você faz e que me fizeram admirá-la ainda mais. Obrigada por ser essa orientadora incrível!

Agradeço também a minha orientadora da iniciação cientifica, Elaine, por despertar em mim a paixão pela ciência e por me ensinar muito do que sei, se não fosse por você, eu não estaria aqui hoje. Agradeço também ao meu co-orientador de iniciação cientifica e amigo, Gil, por tudo que você me ensinou, pela paciência durante 4 anos e por não medir esforços para me ajudar sempre, até hoje me salva rs. Serei sempre muito grata a vocês!

Agradeço a Sika, por ser além de técnica, amiga, mãe, salva vidas rs. Obrigada pela paciência e por me salvar com as questões burocráticas!

Pessoal do lab: Ari, Janis, Renan, Edson, Nath e Mari, só tenho a agradecer por tudo que me ensinaram no começo dessa jornada e por terem me recebido tão bem. Paloma, Carmen, Michele, Sarinha, Gabi e Dani, obrigada pelo companheirismo diário, pelo aprendizado e pela paciência de vocês comigo, sei que não é fácil.

Agradeço em especial a Mar, por me ensinar real time e pela ajuda com as coisas do massas, você me salvou e contribuiu muito para o meu trabalho, obrigada também pela amizade, por me ouvir e sempre topar beber uma cervejinha pra relaxar no final do dia rs. Branqs, obrigada por passar tudo que você sabe para mim, pelas infinitas ajudas nos meus experimentos e por me ensinar a ter mais paciência com as pessoas. Obrigada por todas as vezes que ficou até meia noite comigo no lab e ainda me acolheu na sua casa, por todos os desabafos, risos e choros. Obrigada por se tornar além da minha companheira de trabalho, uma grande amiga!

Agradeço aos colegas de departamento, especialmente ao Gustavo, obrigada por sempre me salvar com as coisas do seu lab rico, pelas conversas, risadas e pela amizade!

Agradeço também aos professores colaboradores desse trabalho e seus alunos. Professor Ernani, pela disponibilidade das massas e também, ao Felipe e Fabi, por toda ajuda. Professora Silvya Stuchi, pelas células utilizadas e por todas as dúvidas que tirou quando precisei, agradeço também a Paula pela ajuda com as células e a técnica Silvia por sempre me salvar rs. Professora Silva Berlanga, pela disponibilidade do simulador solar, e as alunas Andrea e Tati pela ajuda com o equipamento. Ao professor Mario Hirata e a professora Sabrina, pela disponibilidade do real time. A professora Dulcineia, pelo empréstimo de aparelhos e reagentes. Ao professor Helder, pela ajuda com as análises de microarray. E ao professor Mauricio, do instituto de química, pela disponibilidade do irradiador e também ao Paulo, por toda ajuda com as irradiações. As meninas da secretaria e a Claudinha e a Rose que nos mantém acordados com os cafés.

Agradeço aos meus amigos: Maridis, Jorge, Mariani, Cleiton, Mara, Clarinha e Isabel, obrigada por serem minha família de coração, por estarem sempre por perto, nos momentos mais importantes da minha vida.

Agradeço as minhas amigas Ingrid, Luelyn e Dani, pelos 24 anos de amizade, por estarem comigo em todos os momentos da minha vida, vocês são minhas irmãs de coração!

Agradeço as minhas amigas Bia, Carla, Drielly, Isa, Ju, Ket, Lari, Marol, Marina, Nath e Thata por serem minhas companheiras, por ouvirem meus desabafos e arrancarem as minhas melhores risadas. Obrigada por estarem comigo para o que der e vier, por me incentivarem e ouvirem minhas histórias do laboratório mesmo sem entender nada rs. Vocês já estiveram e sempre estarão comigo em todos os momentos, eu amo muito vocês!

Agradeço aos meus amigos Vinicius, Fernanda e José que mesmo de longe estão sempre presentes me incentivando a ajudando.

Não posso deixar de agradecer aqueles que mesmo de longe me ajudam de alguma forma, tia Ni, obrigada por ser essa madrinha sensacional, meu avô, meus primos e tios, obrigada pela família maravilhosa que nós temos.

Agradeço também a FAPESP pela bolsa (Processo: 2015/08763-9), e as demais agências de fomento CAPES e CNPq pelo financiamento desta pesquisa.

**Resumo**

SILVA, M.B.B; CAMPA, A. **Efeitos da luz sobre o metabolismo de triptofano em melanócitos e melanomas.** (Dissertação de mestrado). **v**ol. 1, 86 f. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Apesar de ser bem conhecido que a radiação ultravioleta (UV) causa danos na pele, já foram descritos alguns efeitos benéficos desta radiação, como por exemplo a sensação de bem estar proporcionado pela exposição a luz. Na pele, o triptofano (Trp) é metabolizado a compostos biologicamente ativos, e acredita-se que a síntese de serotonina (SER), um dos metabólitos do Trp, na fototerapia seja parte dos mecanismos de remissão da depressão de pacientes com desordem de humor sazonal. Ainda, a radiação UV induz diretamente a expressão e atividade de TDO, enzima que catalisa a transformação de Trp em quinurenina (KYN), em bactérias, efeito que ainda não havia sido estudado em células humanas. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a habilidade da radiação UV-A em modular a expressão de enzimas envolvidas nas rotas catabólicas do Trp em melanócitos e melanomas. Para isso foi realizada a padronização das condições de radiação UV-A através de ensaio de viabilidade celular, e então definimos condições que não levaram a morte das células (1,5 J/cm² para melanócitos e 3 e 6 J/cm² para melanomas). A radiação UV-A aumentou a expressão de IDO e TDO nos melanomas, enzimas que favorecem a progressão tumoral, e não só essas enzimas, houve aumento da expressão de KYNU e KMO, que também estão envolvidas na progressão tumoral. Além disso, a expressão de AANAT e HIOMT, responsáveis pela produção de melatonina (MLT), foi maior nos melanomas após 48 horas da radiação, enquanto a enzima INMT teve sua expressão aumentada em todos os tempos. O aumento de INMT em melanomas é muito interessante e podemos relacionar ao bem estar proporcionado pela exposição à luz, já que o produto dessa enzima, DMT, é conhecido por proporcionar essa sensação, porém o aumento observado na expressão de IDO e TDO em melanomas, indica um efeito nocivo da luz associado a produção de moléculas que estão fortemente ligadas aos processos de progressão e imunoescape tumoral. Os melanócitos parecem possuir menor susceptibilidade a radiação UV-A, pois as únicas enzimas que tiveram expressão aumentada após a radiação foram a KMO e a TPH1, e apesar da enzima TPH1 ter a expressão aumentada, esse aumento foi modesto o que nos levou a pensar que outras células da pele possam ter um papel mais relevante na produção de SER ou então outras condições de radiação.

**Palavras-Chaves:** Melanócitos, melanomas, triptofano, metabolismo e radiação UV-A.

**Abstract**

SILVA, M.B.B; CAMPA, A. **Effect of light on tryptophan metabolism in melanocytes and melanomas.** (Master's thesis). **v**ol. 1, 86 f. Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2017.

Although it is well known that ultraviolet (UV) radiation causes skin damage, it was already described some benefits to this radiation, for instance the well-being feelings provided by light exposure. In the skin, tryptophan (Trp) is metabolized to biologically active compounds, and it is believed that the synthesis of serotonin, one of tryptophan metabolites, in phototherapy is part of mechanisms of remission of depression in patients with seasonal mood disorder. Moreover, in bacteria the UV radiation directly induces the expression and activity of TDO, the enzyme that catalyzes the metabolization of Trp to kynurenine (KYN). This effect has not been studied in human cells yet. Therefore, the objective of this work was to evaluate if UV-A radiation modulates the expression of enzymes involved in melanocytes and melanoma Trp metabolism. For this aim, we standardized the UV-A radiation conditions through cell viability assay, and then we defined the better conditions to avoid cell death (1,5 J/cm² to melanocytes and 3 and 6 J/cm² to melanomas). The UV-A radiation increased the expression of IDO and TDO in melanomas, enzymes that contribute to tumor immune-escape. The expression of KYNU and KMO also increased, and these enzymes are also involved with some types of tumors progression. Furthermore, the expression of AANAT and HIOMT, responsible for melatonin (MLT) production, was higher in melanomas after 48 hours of radiation while INMT had an increased expression at all times. The increase of INMT by melanomas is very interesting and can be related to the well being provided by exposure to light, since the product of this enzyme, DMT, is known to provide this sensation. However, the observed increased of expression of IDO and TDO in melanomas indicates a harmful effect of light associated with the production of molecules linked to tumor progression and immune-escape processes. The melanocytes appear to be less susceptible to UV-A radiation, because only the enzymes KMO and TPH1 had their expression increased after radiation, and for TPH1 this effect was relatively small. Thus, we believe that other skin cells may have a more relevant role in SER production or other radiation conditions.

**Key Words:** Melanocytes, melanomas, tryptophan, metabolism and UV-A radiation.

**Sumário**

Lista de abreviaturas.....13

Lista de figuras.....17

Lista de tabelas.....18

1.Introdução.....19

1.1. Interação da pele com a luz.....20

1.2. Metabolismo do Triptofano.....22

1.2.1. Luz, bem estar e metabolismo do triptofano.....28

1.2.2. Fotomodulação de enzimas.....29

1.2.3. Metabolismo do Triptofano e atividades biológicas destes metabólitos nas células da pele.....30

1.2.4. Metabolismo do Trp no microambiente tumoral.....32

2.Justificativa.....36

3.Objetivos.....37

3.1. Objetivos específicos.....37

4.Material e Métodos.....38

4.1. Condições de cultura celular.....38

4.2. Irradiação das Células.....39

4.3. Ensaio de viabilidade celular por MTT (brometo de (3-4,5- dimetiltiazol – 2il – 2,5 difeniltetrazólio).....41

4.4. Isolamento de mRNA e expressão gênica.....41

4.5. Análise de Microarray.....42

4.6. Análise Estatística.....42

5. Resultados e Discussão.....43

5.1. Viabilidade Celular.....43

5.2. Expressão gênica.....47

5.2.1. Expressão gênica de melanomas após irradiação.....47

5.2.2. Expressão gênica de melanócitos após irradiação.....55

5.2.3. Análise de Microarray.....60

6. Conclusões.....63

7. Referências.....65

8. Anexos.....79

## Lista de Abreviaturas

**5-HTP:** 5-hidróxi-triptofano

**5-HTT**: transportador de serotonina

**5-OH-KYM:** 5-hidróxi quinuramina

**AA:** ácido antranílico

**AADC:** aminoácido aromático descarboxilase

**AANAT:** arilalquilamina *N*-acetiltransferase

**AADAT:** quinurenina oxo-glutarato transaminase

**ACS:** 2-amino-3 carboximuconato semialdeído

**AFMK:** *N1*-acetil-*N2*-formil-5-metóxiquinuramina

**AhR:** receptor aril hidrocarboneto

**AMK:** *N1*-acetil-α5-metoxiquinuramina

**ALDH1A2:** aldeído desidrogenase tipo II

**cDNA:** DNA complementar

**$CO_2$:** Dióxido de carbono

**DDC:** dopa descarboxilase

**DMEM:** *Dulbecco's modified eagle medium*

**DMFK:** *N,N*-dimetilformiquinurenina

**DMK:** *N,N*-dimetilquinurenina

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DMT:** *N-N*-dimetiltriptamina

**DMT-OH**: DMT-hidroxilada

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

***f* –KYN:** *N*-formil-quinurenina,

**GADPH:** Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

**HAA:** ácido 3-hidróxi-antranílico

**HAAO:** 3 hidroxiantranilato 3,4-dioxigenase

**HIAA:** ácido 5-hidróxi-indol-acético

**HIOMT:** hidróxi-indol-O-metil-tranferase

**HK:** 3–hidróxi–quinurenina

**HU-USP:** Hospital Universitário da Universidade de São Paulo

**IAA:** ácido indolacético

**ICAM-1:** molécula intracelular de adesão 1

**IDO:** indolamina 2,3-dioxigenase

**IFN-γ:** Interferon gama

**INMT:** indoletilamina-*N*-metil-transferase

**IR:** radiação infravermelho

**KA:** ácido quinurênico

**KMO:** quinurenina 3-monooxigenase

**KYN:** *N*-quinurenina

**KYNU:** quinureninase

**LC-MS/MS:** cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

**MAO**: monoamino oxidase

**MLT:** melatonina

**MPO:** mieloperoxidases

**MT1:** receptor de melatonina 1

**MT2:** receptor de melatonina 2

**MTT:** brometo de (3-(4,5- dimetiltiazol – 2il)–2,5 difeniltetrazólio

**NA:** ácido nicotínico

**$NAD^+$:** nicotinamida adenina dinucleotídeo

**NAM:** nicotinamida

**NAMPT:** nicotinato-nucleotídeo difosforilase

**NAT:** *N*-acetil-transferase

**NFK:** *N*-formilquinurenina

**NMDA**: N-metil D-Aspartato

**NrN:** nicotinato D ribonucleotídeo

**PA:** ácido picolínico

**PBS:** tampão fosfato

**PCR:** Reação em cadeia da polimerase

**QA:** ácido quinolínico

**qRT-PCR:** Reação em cadeia da polimerase em tempo real

**QUIM:** quinuramina

**RMA:** Robust Multiarray Averaging)

**RNAm:** ácido ribonucleico mensageiro

**RPMI:** *Roswell Park Memorial Institute medium*

**SAM:** S-adenosil-meotinina

**SER:** serotonina

**SFB:** soro fetal bovino

**TCLE:** termo de consentimento livre e esclarecido

**TDO:** triptofano 2,3-dioxigenase

**TNF-α:** fator de necrose tumoral alfa

**TPH1:** hidróxi-triptofano-hidróxilase

**Trp:** triptofano

**TRY:** triptamina

**UV:** radiação ultravioleta

**UV-A:** radiação ultravioleta A

**UV-B:** radiação ultravioleta B

**UV-C:** radiação ultravioleta C

**Via KYN:** via das quinureninas

**Via SER:** via serotoninérgica

**Via TRY:** via das triptaminas

**XA:** ácido xanturênico

## Lista de Figuras

**Figura 1:** Penetração relativa da radiação solar na pele humana de acordo com o comprimento de onda.....21

**Figura 2:** Metabolismo do Trp pela via das quinureninas (via KYN).....24

**Figura 3:** Metabolismo do Trp pela via serotoninérgica (via SER).....26

**Figura 4:** Metabolismo do Trp pela via TRY.....27

**Figura 5:** Imagem do irradiador UV-A e espectro de emissão das lâmpadas.....40

**Figura 6:** Curva de irradiação de melanomas.....44

**Figura 7:** Curva de irradiação de melanócitos.....45

**Figura 8:** Expressão gênica de melanomas das enzimas da via KYN por PCR em tempo real.....49

**Figura 9:** Expressão gênica de melanomas das enzimas da via SER por PCR em tempo real.....52

**Figura 10:** Expressão gênica de melanomas das enzimas da VIA TRY por PCR em tempo real.....54

**Figura 11:** Expressão gênica de melanócitos enzimas das via KYN por PCR em tempo real.....56

**Figura 12:** Expressão gênica de melanócitos enzimas das via SER por PCR em tempo real.....58

**Figura 13:** Expressão gênica de melanócitos da enzima INMT (VIA TRY) por PCR em tempo real.....59

**Figura 14:** Expressão das enzimas das vias do Trp.....61

## Lista de Tabelas

**Tabela 1:** Condições de irradiação utilizadas.....40

## 1. Introdução

As radiações ultravioleta (UV), visível e infravermelho (IR) interagem com a pele e a medida que penetram nesse tecido, podem ser dispersas em várias direções dependendo da absorção de moléculas e do comprimento de onda da radiação (Nielsen *et al*., 2008). A radiação UV especialmente é altamente absorvida por moléculas orgânicas como proteínas, lipídeos e DNA (Natarajan *et al*., 2014).

A energia absorvida da radiação UV não é convertida apenas em calor, como é o caso da radiação IR, mas também pode induzir reações fotoquímicas (Muthusamy *et al*., 2010) e apesar de ser bem conhecido que a radiação UV causa danos celulares, já foram descritos alguns benefícios para essa radiação, como a sensação de bem estar proporcionado pela exposição a luz solar (Juzeniene *et al.*, 2012) e acredita-se que a síntese de serotonina, um dos metabólitos do Trp, por células da pele, possa colaborar com esse fato.

Nesse contexto, diversos metabólitos e enzimas das vias catabólicas do Trp possuem efeitos nas células normais e tumorais da pele, seja na sua fisiologia ou na progressão tumoral. Além disso, essas células possuem relação direta com a radiação solar e sabe-se que a luz pode modular direta ou indiretamente a atividade de enzimas. É neste cenário que se localiza esta dissertação, aqui avaliamos o efeito da luz na expressão de enzimas envolvidas nas rotas metabólicas do Trp em melanócitos primários e melanomas (SK-MEL 147).

## 1.1. Interação da pele com a luz

A vida no planeta evoluiu e é sustentada sob influência direta da luz solar. A interação dos seres vivos com todo o espectro da radiação solar propiciou uma grande variedade de processos bioquímicos de relação direta entre fótons com o sistema tegumentar das mais diversas espécies (Osmola-Mańkowska *et al*., 2012). A fotossíntese nas plantas, a síntese de vitamina D, o aquecimento para seres homeotermos, a visão, e o ciclo circadiano são exemplos desta interação.

A luz solar interage diretamente com a pele, que é uma barreira biológica capaz de proteger o meio interno do ambiente externo, devido a sua posição estratégica (Slominski *et al*., 2000). A pele é modificada pela luz, inclusive modificando, mesmo que temporariamente, sua coloração. Outro aspecto particularmente interessante é o bem estar psicológico proporcionado pela interação de mamíferos com a luz solar (Mead, 2008). Por outro lado, a exposição solar pode levar ao envelhecimento da pele e a carcinogênese (Helfrich *et al*., 2008; Young, 2009). A luz solar é composta por um amplo espectro que compreende a radiação ultravioleta (UV) (6% do espectro, comprimento de 200 a 400 nm), luz visível (52% do espectro, comprimento de onda de 400 a 700 nm) e radiação infravermelho (IR) (42% do espectro, 700 a 3000) (Ichihashi *et al*., 2009), sendo que esses comprimentos de onda estão relacionados com a diferente penetração da radiação solar nas camadas da pele (Figura 1).

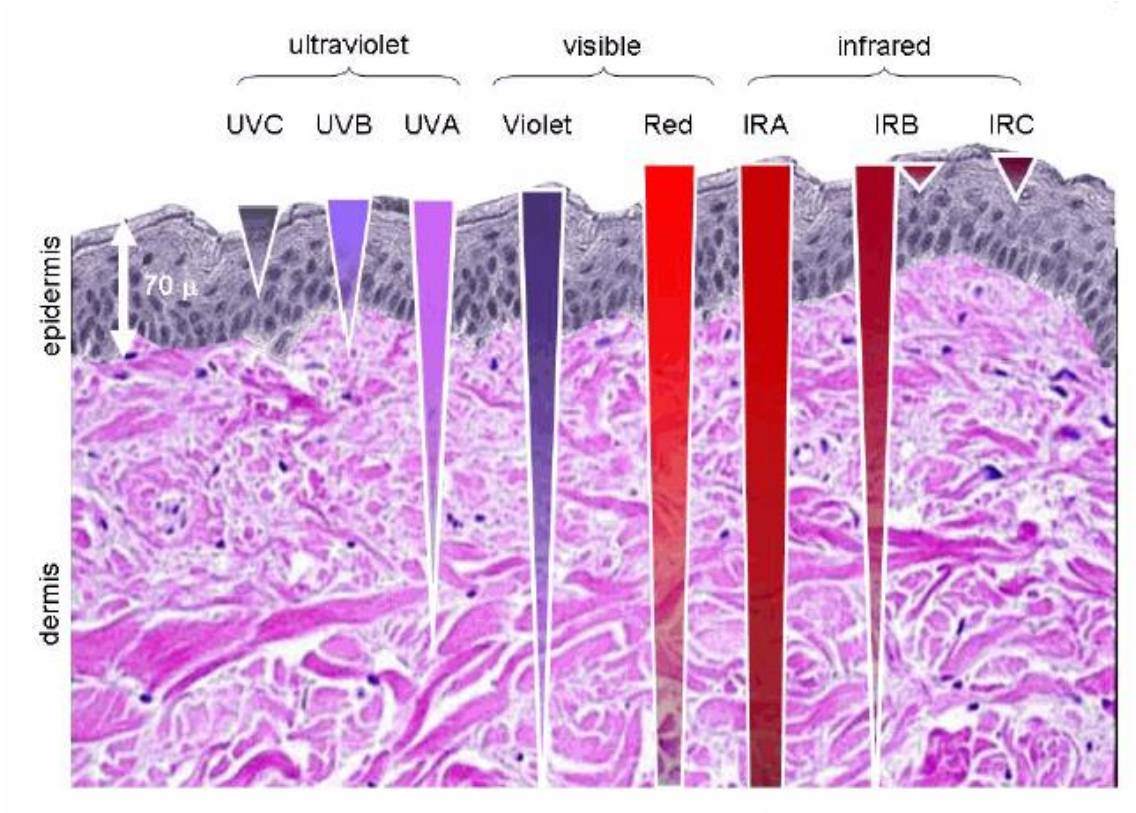



**Figura 1:** Penetração relativa da radiação solar na pele humana de acordo com o comprimento de onda (European Union, 2012).

A radiação solar interage com a pele através de absorção, reflexão e mecanismos de espalhamento, os quais são determinados, em grande parte, pela natureza das múltiplas camadas da pele e das características físicas da radiação (Nielsen *et al*., 2008; Lui *et al*., 2007). A penetração da luz solar na pele é divida em dois processos. O primeiro processo ocorre quando os fótons penetram nas células da pele induzindo alterações bioquímicas. Quando absorvida, a energia do fóton é transferida para um cromóforo e, portanto, a profundidade de penetração da radiação é afetada pela posição e pelo espectro de absorção dos cromóforos presentes na pele. O segundo processo que ocorre é o espalhamento, dependente do comprimento de onda do fóton e

que determina a profundidade da penetração da radiação na pele (Diffey e Kochevar, 2007).

Um dos primeiros e principais processos de resposta à exposição à luz solar, seja ultravioleta ou visível é a rápida indução da melanogênese (Ramasubramaniam *et al*, 2001; Pathak *et al*., 1962), um processo bioquímico que gera a síntese de melanina e consequente pigmentação da pele. Esse processo complexo ocorre nos melanócitos e se estende aos queratinócitos através da transferência dos melanossomas (Lin *et al*., 2007), onde a melanina irá realizar sua atividade fotoprotetora (Wasmeier et al., 2008).

A radiação UV-A, especialmente, interage com as células da pele por fotossensibilização e gera espécies tripletes, oxigênio singlete e posteriormente, outras espécies radicalares (Berneburg *et al*., 1999). O UV-A é absorvido por cromóforos naturais da pele como a melanina e as flavinas. Além disso, UV-A penetra mais profundamente nas camadas da pele, atingindo a região dermo-epidérmica e a derme, onde se localizam os melanócitos e melanomas (Agar *et al*., 2004).

## 1.2. Metabolismo do Triptofano

O triptofano (Trp) é um aminoácido essencial que possui um importante papel para a biossíntese de proteínas, e ainda é precursor de diversos compostos biologicamente ativos. Esses compostos são produzidos por três rotas catabólicas distintas. São elas, via das quinureninas (via KYN), via serotoninérgica/melatoninérgica (via SER) e via das triptaminas (via TRY), sendo a via das quinureninas (Via KYN) seu principal fluxo catabólico.

Na via KYN, o Trp é oxidado a *N*-formil-quinurenina, *f* -KYN, por uma reação de deformilação através de arilformidases constitutivas (3.5.1.9), gerando o metabólito quinurenina (KYN). As enzimas triptofano 2,3 dioxigenase (TDO, 1.13.11.11), enzima hepática e indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO, 1.13.11.52), enzima presente em diversos tecidos e células, são as responsáveis pela catálise do Trp à *f*-KYN (Jacob *et al*., 2005; Reynolds *et al*., 1999 ). Então a partir de KYN, diversos metabólitos podem ser gerados, como o ácido antranílico (AA) através da catálise da enzima quinureninase (3.7.1.3), ácido quinurênico (KA) através da enzima quinurenina oxo-glutarato transaminase (2.6.1.7) e 3–hidroxi–quinurenina (HK) através da enzima quinurenina 3-monooxigenase (1.14.13.9) (Opitiz *et al*., 2007).

HK então é hidrolisado pela enzima quinurenina oxo-glutarato transaminase (2.6.1.7) gerando ácido xanturênico (XA) (Gobaille *et al*., 2008) ou então pode ser hidrolisado pela enzima quinureninase (3.7.1.3), gerando ácido 3-hidroxi-antranílico (HAA). HAA também pode ser sintetizado a partir da hidroxilação de AA pela enzima antranilato-3-monooxigenase (1.14.16.3). Então, HAA pela ação da enzima 3 hidroxiantranilato 3,4-dioxigenase (1.13.11.6) pode ser convertido em 2-amino-3 carboximuconato semialdeído (ACS), que é rearranjado não enzimaticamente a ácido quinolínico (QA), que inicia o metabolismo de nicotinamida (NAM). ACS pode também ser descarboxilado pela ACS decarboxilase (4.1.1.45) e gerar 2 aminomuconato semialdeído que é rearranjado a ácido picolínico (PA) (Peters, 1991).

Nos últimos passos da via KYN, o QA é usado pela enzima nicotinato-nucleotídeo difosforilase (2.4.2.19) para a síntese de nicotinato D ribonucleotídeo (NrN). NrN então, participa da síntese do ácido nicotínico (NA) e nicotinamida (NAM). Todos esses metabólitos: QA, NA e NAM podem ser utilizados para sintetizar

NAD+ (Moffett *et al*., 2003; Keszthelyi *et al*., 2009). A via KYN é apresentada na figura 2.

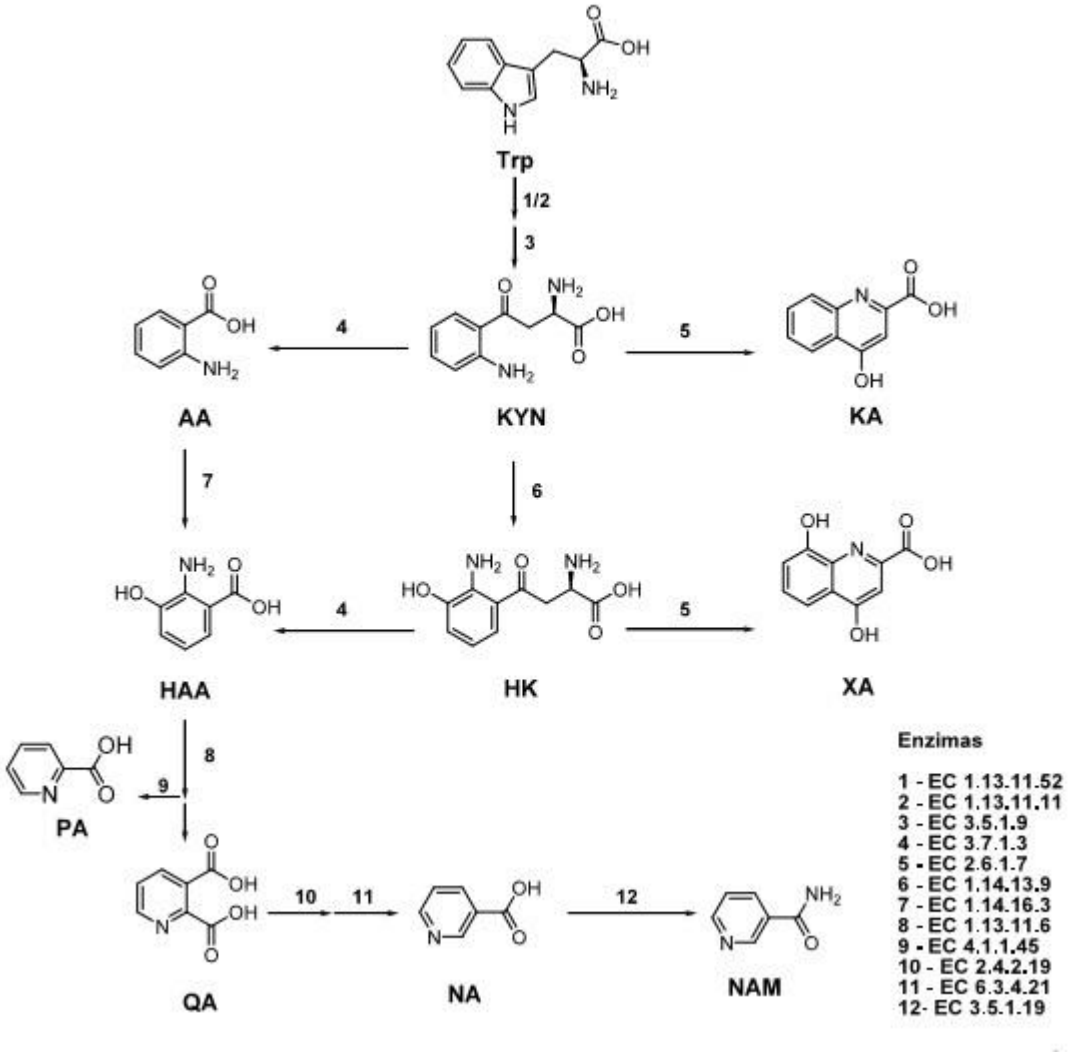



**Figura 2:** Metabolismo do Trp pela via das quinureninas (via KYN).

Outra via de metabolização do Trp muito estudada é a via serotoninérgica (via SER). Em condições normais, apenas 2% do Trp que é ingerido é direcionado a via SER (Kema *et al*., 2000). Nesta via, o Trp é hidroxilado na quinta posição do anel indólico pela triptofano hidroxilase-1 (1.14.16.4) e forma 5-hidróxi-triptofano, com posterior descaboxilação pela dopa descarboxilase (ou aminoácidos aromáticos

descarboxilase, 4.1.1.28), gerando serotonina (SER) (Nordlind *et al*., 2008). Tanto 5-hidróxi-triptofano como a SER podem sofrer ação da IDO e serem convertidos a 5-hidroxi-quinurenina e 5-hidróxi quinuramina (5-OH-KYM), respectivamente, o que demonstra que as vias KYN e SER se intercomunicam.

A SER pode ser catalisada pelas enzimas monoamino oxidases, MAOA (1.4.3.4) e formar 5-hidroxi-indol-acetalaldeído (HIAA) (Tekes, 2008), que em células do sistema nervoso central encontra-se em equilíbrio com o ácido 5-hidroxi-indol-tiazolidina carboxílico (produto da condensação do 5-hidroxi-indol-acetalaldeído com uma *L*-cisteína). Existem hipóteses de que o produto desse equilíbrio, ácido 5-hidroxi-indol-acético (HIAA), seja formado por uma aldeído oxidase I (1.2.3.1) a partir do ácido 5-hidroxi-indol-tiazolidina carboxílico, porém outros grupos acreditam que essa formação se dê a partir do deslocamento do equilíbrio para 5-hidroxi-indol-acetalaldeído, por ação de uma aldeído desidrogenase tipo II (1.2.1.3) (Squires *et al*., 2006).

Algumas células são capazes de utilizar SER para a síntese de melatonina (MLT) através da rota intermediada por *N*-acetilserotonina. A SER sofre *N*-acetilação pela arilalquilamina-*N*-acetiltransferase (2.3.1.87) seguida de uma metilação por acetilserotonina-O-metiltransferase (2.1.1.4) e forma *N*-acetil-5-metóxi triptamina, a melatonina (Lerner *et al*., 1959; Sugden, 1989). A melatonina tem capacidade de capturar radicais de oxigênio e gerar diferentes metabólitos. O principal metabólito da melatonina é o *N*1-acetil-*N*2-formil-5-metóxiquinuramina (AFMK), que é obtido por reações com radicais hidroxila e oxigênio *singlete*, e que também pode ser produzido por catálise enzimática por mieloperoxidase de neutrófilos. O AFMK obtido por oxidação da MLT pode ser deformilado por uma formidase e dar origem a *N*1-acetil-

α5-metoxiquinuramina (AMK) (Hirata *et al*., 1974). Na figura 3 é apresentada a via SER.

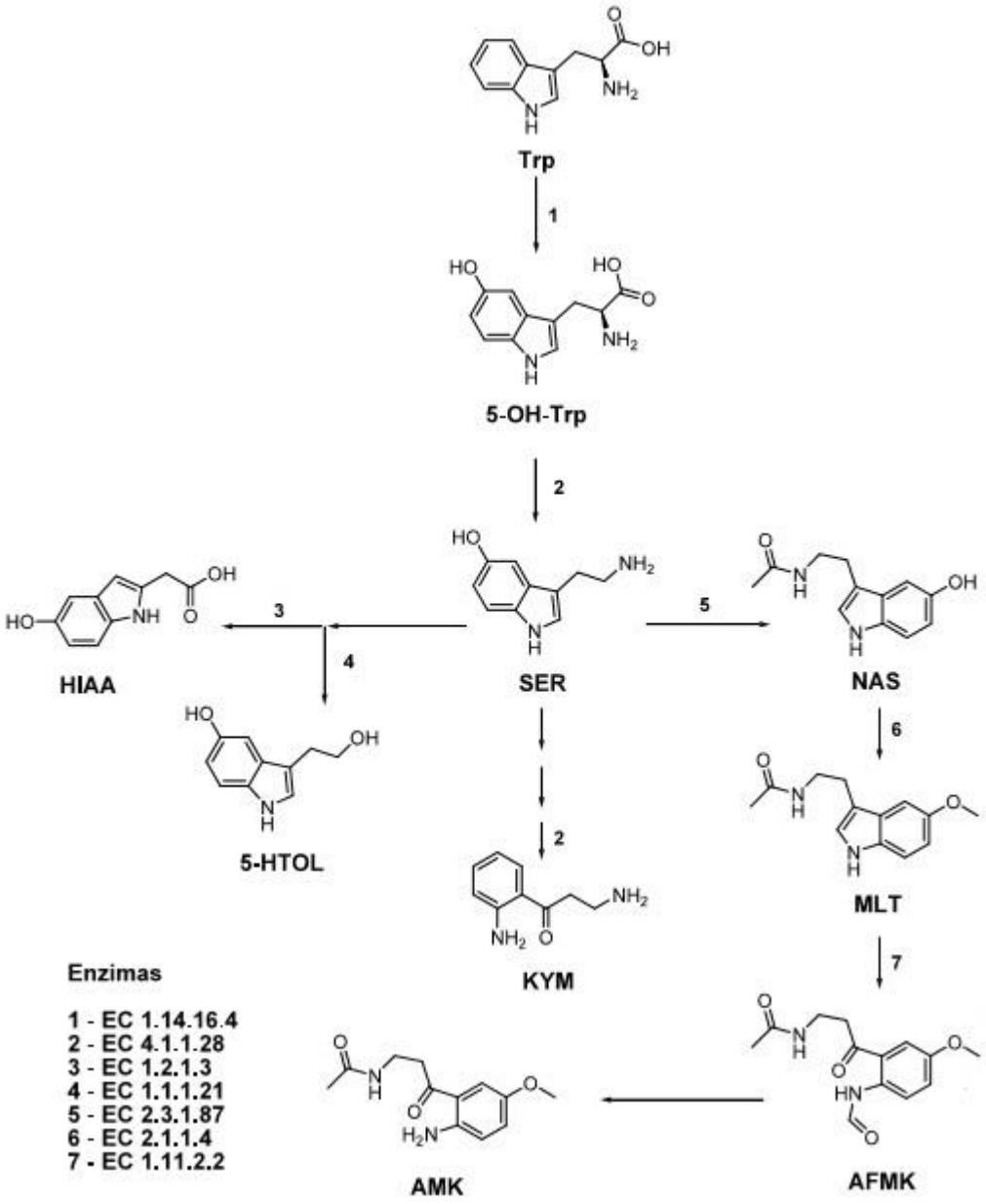



**Figura 3:** Metabolismo do Trp pela via serotoninérgica (via SER).

Além das vias KYN e SER, outros produtos resultantes do catabolismo endógeno do Trp podem ser observados na via das triptaminas (via TRY). Nesta via, inicialmente o Trp sofre uma descarboxilação catalisada pela enzima aminoácido

aromático descarboxilase (4.1.1.28), formando a triptamina (TRY). Em seguida, a TRY é dimetilada pela S-adenosil-metionina (SAM) por um ataque nucleofílico por uma reação catalisada pela enzima indoletilamina-*N*-metil-transferase (2.1.1.49), gerando assim dimetiltriptamina (DMT). No catabolismo da TRY pode ocorrer também a formação do ácido-3-indol acético (IAA) (Kim *et al*., 2009).

O nosso grupo demonstrou que a DMT também pode ser hidroxilada por mieloperoxidases (MPO) proveniente de neutrófilos ativados, gerando bufotenina ou psilocina (ambas hidroxiladas no anel benzênico do DMT, em diferentes posições, DMT-OH) e peroxidases foram responsáveis pela formação dos produtos de abertura de anel indólico, análogos da KYN, *N*,*N* dimetilformiquinurenina (DMFK) e *N*,*N*-dimetilquinurenina (DMK) (Gomes *et al*., 2014). Na figura 4, abaixo é apresentada a via TRY.

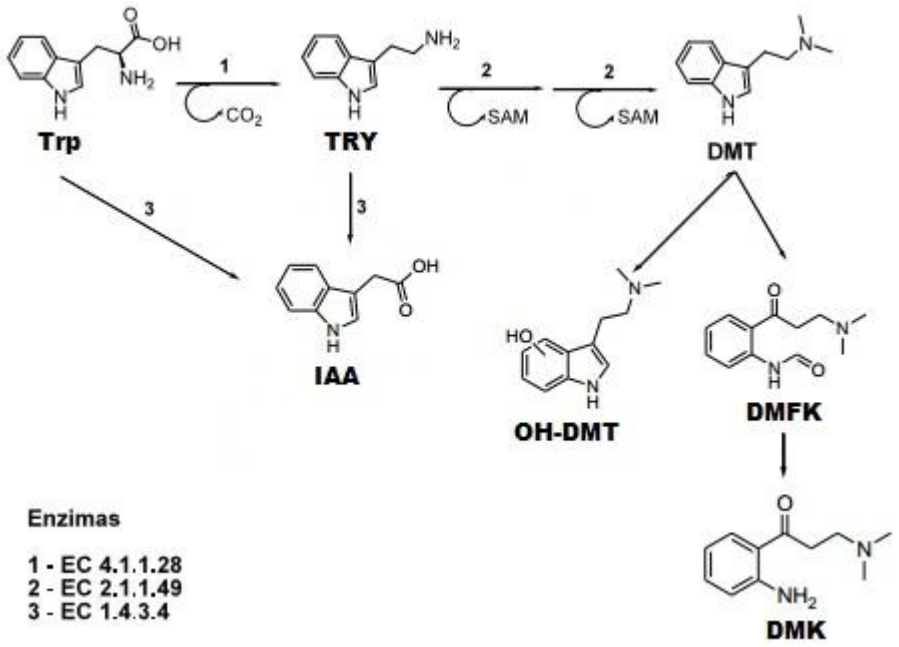



**Figura 4:** Metabolismo do Trp pela via TRY.

### 1.2.1. Luz, bem estar e metabolismo do triptofano

A luz é capaz de mudar o ciclo circadiano e os ritmos sazonais em humanos e animais. Nos anos 80 se iniciam as tentativas de terapia com luz, através da extensão das horas de luz/dia nos meses de inverno, para tratar de transtornos afetivos sazonais (Rosenthal *et al*., 1984). Sabe-se que em zonas temperadas, as pessoas se sentem mais felizes e com mais energia em dias claros e ensolarados e que há um declínio no humor e energia durante a temporada de inverno e dias escuros (Praschak-rieder *et al*., 2008). Desde então, um notável número de estudos foi capaz de provar a relevância da terapia com luz no tratamento de transtornos de humor sazonais ou não.

Um estudo realizado com pacientes com depressão associada ao transtorno sazonal, após remissão clínica, livre de drogas, que foram submetidos a uma depleção de triptofano, mostrou que esta depleção leva a uma recaída depressiva transitória, e ainda, acredita-se que a síntese de serotonina está envolvida no mecanismo de ação da terapia de luz (Neumeister et al., 1997).

A serotonina tem um papel predominante na modulação do comportamento, emoções e ritmos circadianos (Purves, 2004). O mecanismo fisiológico mais importante para controlar as concentrações de serotonina é a recaptação da serotonina pelo neurônio pré-sináptico através do transportador de serotonina (5-HTT) (Rudnick *et al*., 1993; Ramamoorthy *et al*., 1993). A alta densidade de 5-HTT está associada com baixas concentrações de serotonina extracelular e vice-versa. Um estudo com indivíduos saudáveis mostrou que a ligação de 5-HTT no cérebro humano varia de acordo com a estação do ano. A ligação mais elevada de 5-HTT ocorreu durante o outono e o inverno, meses mais escuros, enquanto os menores valores de ligação foram encontrados no verão e na primavera (Praschak-Rieder *et al*., 2008). Esses

resultados podem explicar a ocorrência de episódios depressivos em pacientes com desordem de humor sazonal.

Já se sabe que a enzima hidroxi-triptofano-hidróxilase (TPH1), responsável pela transformação de triptofano em serotonina, é expressa em células normais e transformadas da pele (Slominski *et al*., 2002). Além disso, verificou-se que a radiação ultravioleta inibe a expressão do gene TPH em células de melanoma humano, sugerindo um potencial de regulação ambiental da via TPH (Ryoo *et al*., 2001).

### 1.2.2. Fotomodulação de enzimas

Um estudo de 1970 foi o primeiro a descrever a fotoativação de uma enzima e mostrar que a luz pode aumentar a atividade da urocanase em *Pseudomonas putida* (Hug, 1970). A luz também regula outras enzimas, como a quimotripsina (Stephen *et a*l., 2006), glicogênio sintase e glicogênio fosforilase (Díaz-Lobo *et al*., 2015). Além disso, já foi descrito que a luz UV induz diretamente a expressão e atividade de TDO em bactérias (Brady *et al*., 1973), efeito que ainda não havia sido estudado em células de mamíferos.

Os melanócitos são células fotossensíveis que respondem a doses variáveis de exposição aos raios UV. Um estudo mostrou que após a radiação com luz UV total em melanócitos, a conversão de serotonina em melatonina foi inibida, porém essa conversão voltou a ser realizada após 6 horas de incubação no escuro, indicando reativação de AANAT e HIOMT (Iyengar, 1998).

### 1.2.3 Metabolismo do Triptofano e atividades biológicas destes metabólitos nas células da pele

Diferentes metabólitos do Trp colaboram para a fisiologia da pele. A serotonina na pele exerce ação vasodilatadora, pró-inflamatória e ação pruritogênica (Seuwen and Pouyssegur, 1990). A serotonina ainda apresenta efeitos sobre a proliferação celular, por exemplo, estimula o crescimento de fibroblastos dérmicos de maneira dose dependente (Julius, 1991). A enzima TPH1, que catalisa o passo limitante para a síntese de serotonina, é expressa em todas as células normais da pele (melanócitos, queratinócitos e fibroblastos) e também em células tumorais, como em melanomas (Slominski *et al*., 2002; Slominski *et al*., 2003).

Em relação a melatonina, a pele humana expressa ambos os receptores de melatonina (MT1 e MT2), apesar do MT1 ser o receptor predominante. Os efeitos da melatonina na pele humana são pouco descritos, embora possam ter efeito anti-proliferativos em melanomas e efeitos protetores contra a radiação UV, que causa danos nas células da pele (Nickel *et al*., 2000; Ryoo *et al*., 2001). A MLT pode controlar o crescimento tumoral da pele por sua ação anti-tumoral (Sainz *et al*., 2003) e anti-angiogênica (Lissoni *et al*., 2001) ou então por suas atividades imunomodulatórias, anti-proliferativas e antioxidantes (Bartsch *et al*., 2002). Existe também uma relação direta entre o dano celular causado por UV e a indução da expressão de receptores MT1 e MT2 em queratinócitos e melanócitos (Slominski *et al*., 1993). Além disso, o metabólito da melatonina *N*1-acetil-formil-5-metoxiquinurenina (AFMK) suprime a síntese de espécies reativas de oxigênio induzida por UV em mitocôndria de maneira mais eficiente que a própria melatonina (Manda *et al*., 2007).

Os efeitos dos metabólitos da via das TRY na pele ainda são poucos descritos. Conhece-se apenas que a captação e consumo de TRY por melanócitos está relacionada a fotomodulação do ciclo celular dessas células (Iyengar, 1998). Além disso, um trabalho recente do nosso grupo de pesquisa mostrou a habilidade de linhagens celulares de melanoma humano sintetizarem TRY e DMT (Gomes *et al*., 2014).

Metabólitos da via KYN tem sido alvo do estudo do metabolismo da pele. A citocina IFN-γ é o principal indutor de IDO (Mead, 2008), e nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente que diferentes células da pele são capazes de responder ao tratamento de IFN-γ quanto à síntese e atividade de IDO, induzindo a via KYN (Moreno et al., 2013). Também, o IFN-γ tem sido apontado como agente modulador da melanogênese (Natarajan *et al*., 2014), sugerindo que o controle exercido por IFN-γ talvez seja realizado por modulação do metabolismo de triptofano. Ainda sobre a via KYN, QA, um dos metabólitos finais dessa rota, é agonista do receptor NMDA (Stone *et al*., 1981), necessário para a manutenção da morfologia dos melanócitos (Hoogduijn *et al*., 2006).

Estudos recentes realizados com lesão da pele mostraram a participação da enzima IDO e principalmente do metabólito KYN como agentes anticicatrizantes e antifibróticos na recuperação de lesões, uma vez que KYN e seu metabólito KA são capazes de elevar a expressão de metaloproteinases de matriz 1 e 3 e inibir a síntese de colágeno tipo-1 e fibronectina em fibroblastos dérmicos (Poormasjedi-Meibod et al., 2014).

Em um estudo recente do nosso grupo, onde foi avaliado metabolismo do triptofano em células normais da pele e também em diferentes linhagens de melanoma humano, foi demonstrado que melanócitos respondem mais ao tratamento com IFN- γ em relação a via KYN do que os melanomas (Clara *et al*., 2015), o que nos despertou interesse em estudar mais amplamente essas células e também a relação dos melanócitos com as outras vias de metabolização do Trp.

Além da participação na fisiologia da pele, a marcação de IDO em linfonodos sentinela de pacientes com melanoma vem sendo considerada como marcador de mau prognóstico (Speeckaert *et al*., 2012). Não só a marcação de IDO em linfonodos, mas a diminuição sérica de Trp e o aumento de KYN (aumento da relação KYN/Trp) têm sido descritos como marcador prognóstico para pacientes com melanoma (Weinlich *et al*., 2007).

### 1.2.4. Metabolismo do Trp no microambiente tumoral

Um dos principais mecanismos de imunoescape e progressão tumoral está relacionado ao aumento da expressão da enzima IDO com aumento da produção de KYN (Kim et al., 2007; Munn et al., 2007). O aumento da expressão de IDO e aumento da razão KYN/Trp plasmáticos tem sido associada a um mau prognóstico e a metástases em muitos cânceres, como por exemplo, em melanomas (Weinlich *et al.*, 2007; Ino *et al.*, 2008; Speeckaert *et al.*, 2012). Como já mencionado, KYN também é produzida pela ação da enzima TDO e mais recentemente alguns estudos apontam para seu papel na progressão tumoral (Pilotte *et al*, 2012).

A inibição das enzimas IDO e TDO tem sido considerada uma estratégia para a restauração da imunidade (Muller et al., 2006). De fato, mais de 20 estudos clínicos

com diferentes inibidores de IDO estão sendo realizados (em acesso ao website *clinicaltrials.gov* em 03.01.2015).

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

Além disso, HK pode suprimir a proliferação de linfócitos T-CD4$^{+}$ e induzir o desenvolvimento do fenótipo regulatório (Zaher *et al.*, 2011). AA e HAA estão envolvidos com a etiologia do câncer de bexiga (Teulings *et al.*, 1973) e ambos metabólitos podem auto-oxidar e gerar radicais intermediários mutagênicos que podem interagir com o mesmo receptor da KYN, o AhR (Chung et al., 2011). Além disso, o aumento de HAA induz apoptose em linfócitos T CD8$^{+}$, e a proliferação de todos os tipos de linfócitos é bloqueada (Weber *et al.*, 2006).

KA, por sua vez, é capaz de induzir a adesão de monócitos a vasos e promover o desprendimento de L-selectina da membrana celular de neutrófilos, indicando seu potencial na ativação e recrutamento de leucócitos (Barth *et al.*, 2009). Por outro lado, KA é capaz de diminuir a produção de fator de necrose tumoral (TNF-α) por células mononucleares (Tiszlavicz *et al.*, 2011) e também é um potente ligante do AhR (Dinatale *et al.*, 2010). Recentemente foram descritas suas atividades antimigrativa e

antiproliferativa em células CAKI-2, de tumor renal, e sua concentração em tecido de tumores renais humanos aparece decrescida por volta de quatro vezes os valores fisiológicos (Walczak, K., 2012).

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

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

Já a MLT é uma molécula com atividade antitumoral conhecida. É sugerido que ela controla o crescimento tumoral por sua ação anti-angiogênica natural (Lissoni *et al.*, 2001) ou então através de seus efeitos imunomodulatórios, anti-proliferativos e antioxidantes (Bartsch et al., 2002). MLT pode também induzir apoptose em células tumorais (Sainz *et al.*, 2003). Apesar do mecanismo pelo qual a MLT exerça esses efeitos não ser totalmente esclarecido e os resultados originados da sua utilização farmacológica no tratamento de tumores não ser consistente, foi observada uma eficácia da MLT na estabilização de alguns tipos de carcinomas (Ravindra et al., 2006).

O nosso grupo já demonstrou que AFMK e AMK mantêm as atividades biológicas reconhecidas para a MLT e SER sobre células do sistema imune, particularmente na inibição da produção de citocinas e da proliferação celular, muitas vezes em intensidades superiores à própria MLT sugerindo que a metabolização da MLT à AFMK em sítios inflamatórios teria um forte papel imunomodulatório (Silva *et al.*, 2004).

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

## 2. Justificativa

Vários dos compostos das diferentes vias catabólicas do Trp possuem efeitos na pele e possivelmente participem na interação da pele com a luz. Por exemplo, a terapia com luz tem efeito positivo sobre pacientes com depressão e acredita-se que a modulação desse efeito possa ser decorrente da síntese de SER na pele (Neumeister *et al.,* 1997). O presente trabalho visa avaliar a habilidade da luz UV-A em modular amplamente o metabolismo de Trp em melanócitos. Sendo a nossa hipótese a de que a luz module algumas etapas das vias das quinureninas, via serotonérgica e via das triptaminas. É possível ainda que as alterações no metabolismo de Trp mediadas pela luz em tumores de pele possam auxiliar ou regredir a progressão da doença. Desta forma, também avaliamos o efeito da luz UV-A em melanomas.

## 3. Objetivos

Avaliar o efeito da radiação UV-A sobre o metabolismo do triptofano em melanócitos e melanomas.

### 3.1. Objetivos Específicos

1. Padronizar condições de radiação UV-A e tempo de exposição após a radiação que não levem a morte celular.

2. Isolar RNAm e avaliar a expressão das enzimas envolvidas nas rotas metabólicas do triptofano em células irradiadas.

3. Buscar dados públicos de microarray disponíveis no GEO DataSets do National Center for Biotechnology Information (NCBI) referentes a estudos com irradiação em células da pele e realizar análises das enzimas do metabolismo do Trp.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Condições de Cultura Celular

As células primárias da pele (melanócitos) foram isoladas de prepúcio de doadores submetidos à cirurgia de postectomia, frente à concessão livre e esclarecida destes. O procedimento cirúrgico foi realizado no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP) sob responsabilidade de L. Maximiano (Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-HU-USP número 943/09). O isolamento das células da pele a partir de prepúcio foi realizado em colaboração com o Laboratório de Citologia Clínica coordenado pela Profa. Dra. Silvya Stuchi Maria-Engler. Todos os doadores assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), já utilizado pelo grupo de pesquisa da Profa. Silvya Stuchi. Esclarecemos que o presente projeto foi enviado ao Hospital Universitário para que seja alocado como adendo-participante das questões éticas do Comitê já aprovado para as pesquisas do grupo da Profa. Dra. Silvya Stuchi.

Os prepúcios foram lavados, esterilizados e as camadas da pele foram separadas por incubação com dispase (Roche). A epiderme foi desmembrada da derme para o isolamento de queratinócitos e melanócitos com uso de tripsina. A derme foi digerida com colagenase tipo I para isolamento dos fibroblastos. Por fim, as células foram cultivadas em meio de cultura específico para cada tipo celular. Os melanócitos primários foram cultivados em meio 254CF e suplementados com kit de crescimento para melanócitos SKU (ambos da *Cascade Biologics*). Além disso, a linhagem de melanoma humano SK-MEL 147 foi cultivada em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*, Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (50 U/mL) e estreptomicina (50 μg/mL). Todas as células

foram mantidas em estufa a 37 °C contendo atmosfera de 5% de $CO_2$. Todo o procedimento foi feito evitando-se ao máximo a interação das culturas com a luz. Os cuidados que foram tomados incluem transportar as placas em recipiente envolvido com papel alumínio e manusear as células no escuro (sem luz acesa no laboratório).

### 4.2. Irradiação das Células

Para as análises de expressão gênica as células (melanócitos e melanomas) foram mantidas em seus meios específicos e então foram plaqueadas em placa de 100mm e após 24 horas, os meios de cultura específicos foram removidos, e as células foram lavadas com tampão fosfato estéril por duas vezes. Após as lavagens, uma fina camada de tampão fosfato foi colocada sobre as células (5 mL) que foram submetidas ao irradiador de luz UV-A. Após os tempos de radiação, o PBS foi removido e foi adicionada às células os seus respectivos meios de cultura, sendo posteriormente incubadas em estufa por 6, 12, 24 e 48 horas.

Todos os experimentos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interfaces (LPFI) do Prof. Dr. Mauricio S. Baptista no Instituto de Química-USP. O alvo foi padronizar uma condição de irradiação branda que não levou a qualquer lesão celular.

Foram realizadas irradiações com diferentes doses de radiação UV-A, sendo que essas doses foram calculadas considerando a potencia das lâmpadas, a área do detector e o tempo de exposição, segundo a equação:

$$dose\left(\frac{J}{cm^2}\right) = \frac{potência\ (mW)}{área(cm^2)}\ x\ tempo\ (s)$$

Podemos observar na tabela abaixo, as condições de irradiação das células.

| Potência 0,453 Mw | |
|---|---|
| **J/cm²** | **Tempo (minutos)** |
| 0,5 | 5 |
| 1,5 | 15 |
| 3 | 30 |
| 6 | 60 |
| 12 | 120 |
| 18 | 180 |

**Tabela 1:** Condições de irradiação utilizadas.

A intensidade de potência do espectro do irradiador foi de aproximadamente 3,0 mW/cm² e a porcentagem de emissão dos espectros para as energias UV-B 313 nm (0,05%), UV-A 325 nm (0,05%), UV-A 366 nm (98%), visível 405 nm (1,7%) e 430 nm (0,2%). A imagem do irradiador e o espectro de emissão das lâmpadas estão ilustrados na figura 5.

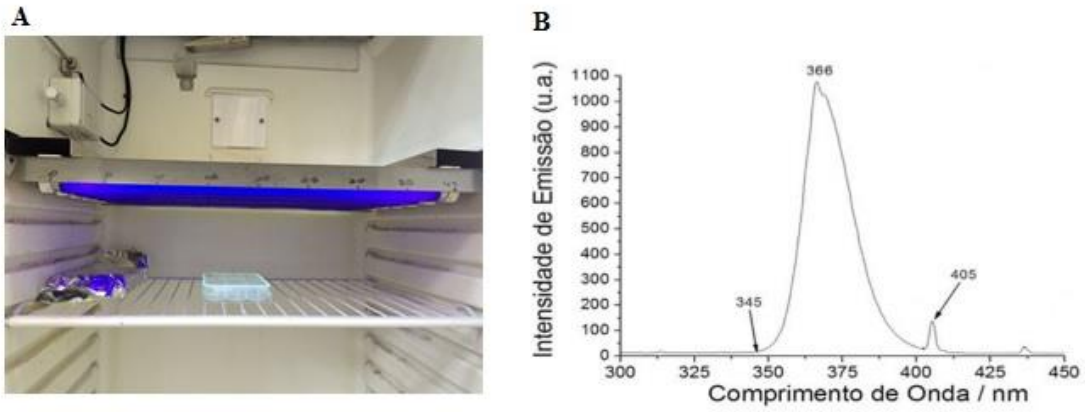



**Figura 5: Imagem do irradiador UV-A e espectro de emissão das lâmpadas. (A)** Posição das placas no momento da irradiação. As células controles são as envolvidas por papel alumínio. **(B)** Espectro de luz UV-A de todas as lâmpadas.

### 4.3. Ensaio de viabilidade celular por MTT (brometo de (3-4,5- dimetiltiazol – 2il – 2,5 difeniltetrazólio)

A viabilidade foi avaliada pelo ensaio de MTT, baseado na redução do sal tetrazólio, pelo sistema enzimático mitocondrial, por meio da atividade das desidrogenases que clivam o anel tetrazólico e convertem o MTT em um produto insolúvel denominado formazan, que por sua vez reflete o funcionamento da atividade mitocondrial e, consequentemente, a viabilidade celular. As células foram incubadas com uma solução de 5mg/ml de MTT durante 3 horas permitindo a formação do formazan (precipitado) sendo dissolvido em DMSO. A absorbância foi mensurada em 570 nm.

### 4.4. Isolamento de mRNA e expressão gênica

O RNA total das células foi extraído com o Kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Até 1 μg do RNA total foi reversamente transcrito usando o kit *High Capacity RNA-to-cDNA kit* (*Applied Biosystems*). Foram realizados estudos da expressão gênica por PCR em tempo real (qRT-PCR) em sistema TaqMan (*Applied Biosystems)*. Para cada reação, a expressão de GADPH (Hs00266705_g1) foi usada como gene endógeno controle. O método de comparação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foi usado para comparar os níveis de expressão de RNAm. Foram estudadas as seguintes moléculas:

1. Enzimas do metabolismo de Trp: IDO1 (EC 1.13.11.52), TDO2 (EC 1.13.11.11), KYNU (EC 3.7.1.3), AADAT (EC 2.6.1.7), KMO (EC 1.14.13.9), HAAO (EC 1.13.11.6), NAMPT (EC 2.4.2.19), TPH1 (EC 1.14.16.4), DDC (EC 4.1.1.28), AANAT (EC 2.3.1.87), HIOMT (EC 2.1.1.4), ALDH1A2 (EC 1.2.1.3), MPO (EC 1.11.2.2), INMT (EC 2.1.1.49) e MAOA (EC 1.4.3.4).

### 4.5. Análise de Microarray

Foram analisados conjuntos de dados de teste de expressão de 13 enzimas envolvidas nas rotas metabólicas do Trp em estudo de microarray disponíveis do banco GEO DataSets referente a análise de pele dorsal de ratos expostos a radiação UV (GSE4066). Os dados brutos publicos estão disponíveis no National Center for Biotechnology Information (NCBI): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo. Os dados de expressão foram normalizados usando RMA (Robust Multiarray Averaging), que incluiu ajuste global de "background" e normalização quantil.

### 4.6. Análise Estatística

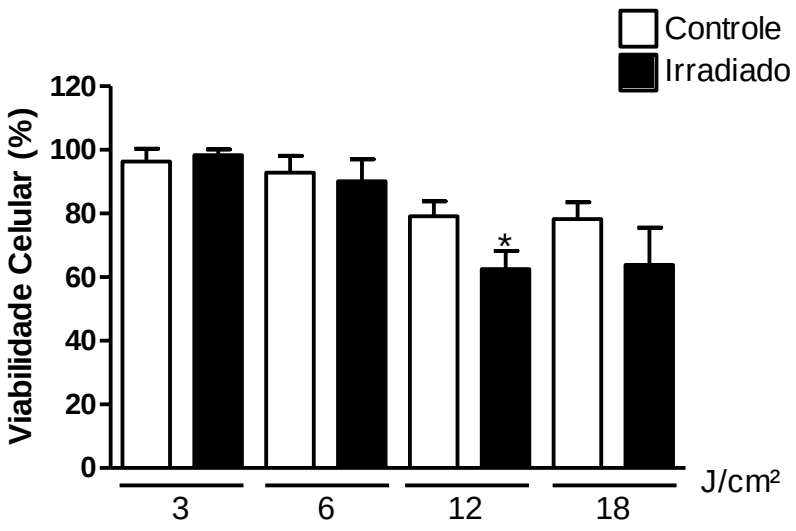
Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de, no mínimo, três experimentos independentes realizados em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise estatística para testes de variância utilizando-se o teste ANOVA e o teste de Tukey para comparações múltiplas de médias, ou então teste t para amostras independente. Valores de P iguais ou menores que 0,05 indicadores da concentração de significância de pelo menos 5% entre as diferenças encontradas, foram considerados estatisticamente significativos.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Viabilidade Celular

Como o nosso objetivo era encontrar uma condição de irradiação que não fosse citotóxica foi necessária a realização de curvas de viabilidade celular com a finalidade de escolher quais doses de radiação seriam utilizadas nesse estudo. Assim escolhemos as doses de 3 e 6 J/cm² para realizar os experimentos com a linhagem de melanoma humano SK-MEL 147, pois foram as maiores doses de irradiação que não levaram a perda de viabilidade, pois houve redução significativa da viabilidade de melanomas a partir da dose de 12 J/cm$^2$ de radiação UV-A (figura 6A). Além disso, na figura 6B podemos observar a morfologia dessas células antes e depois da irradiação.

**A**



**B**

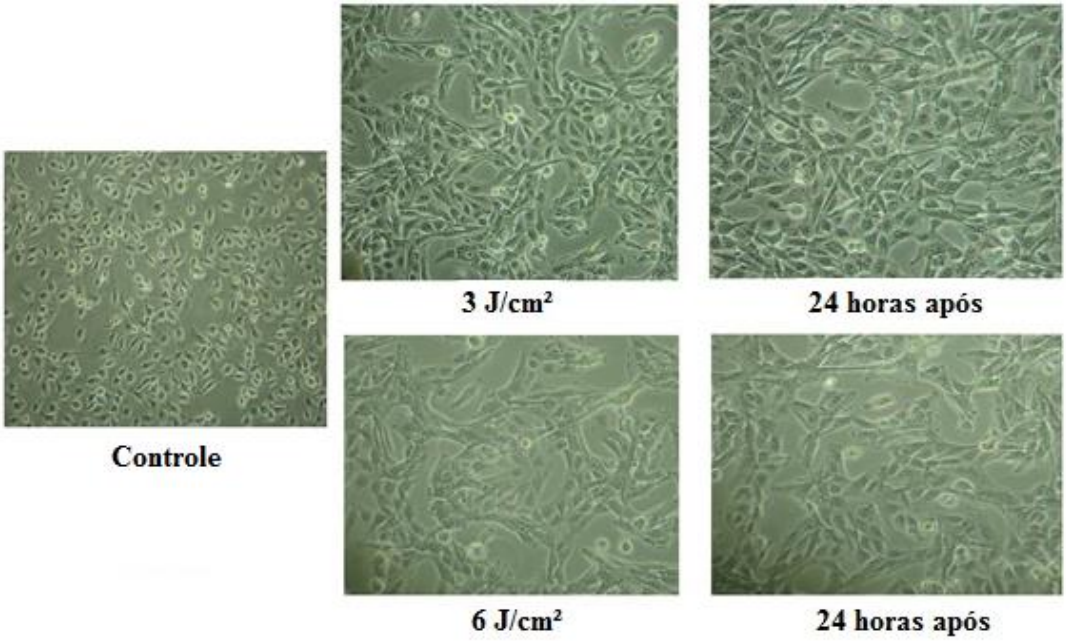
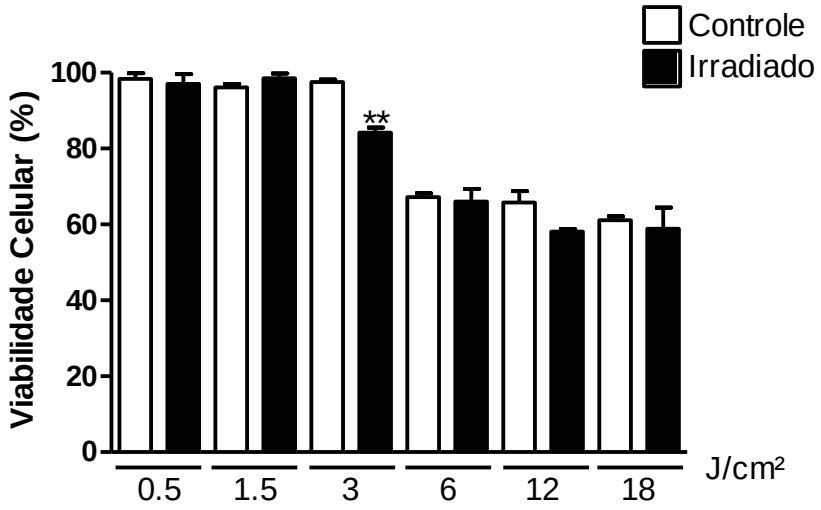



**Figura 6: Curva de irradiação de melanomas. (A)** Viabilidade de melanomas não irradiados e irradiados com doses crescentes de irradiação (3, 6, 12 e 18 J/cm²). As células foram analisadas após 24 horas da irradiação por meio do ensaio de MTT. **(B)** Imagens de microscopia óptica dos melanomas controles, imediatamente após a irradiação e 24 horas após as irradiações de 3 e 6 J/cm². *p< 0,05 em relação ao controle (não irradiado).

Os controles das condições 12 e 18 J/cm² perderam mais a viabilidade quando comparado aos irradiados das condições mais baixas. Uma possibilidade para este ocorrido poderia ser devido ao calor a que estas células foram submetidas uma vez que para os controles passarem pelas mesmas condições do irradiado, as células controles foram colocadas dentro do irradiador envolvidas com papel alumínio. Além disso, as condições irradiadas a 12 e 18 J/cm², perderam a viabilidade após 24 horas.

Para os melanócitos a dose de irradiação escolhida foi de 1,5 J/cm², pois houve redução significativa da viabilidade a partir da dose de 3 J/cm$^2$ de radiação UV-A (figura 7). Além disso, na figura 7B podemos observar a morfologia dessas células antes e depois da irradiação.

**A**




**B**

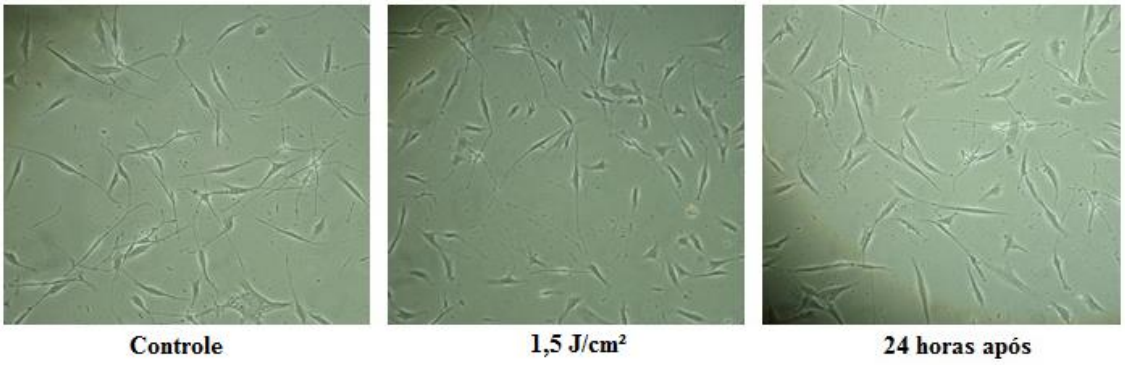



**Figura 7: Curva de irradiação de melanócitos. (A)** Viabilidade de melanócitos não irradiados e irradiados com doses crescentes de irradiação (0.5, 1.5, 3, 6, 12 e 18 J/cm²). As células foram analisadas após 24 horas da irradiação por meio do ensaio de MTT. **(B)** Imagens de microscopia óptica dos melanócitos controles, imediatamente após a irradiação e 24 horas após a irradiação de 1.5 J/cm². **p< 0,01 em relação ao controle (não irradiado).

Um estudo mostrou que doses de radiação UV-A a partir de 2 J/cm$^2$ reduziram a viabilidade melanócitos após 24 horas da radiação (Larsson *et al*., 2005). O que corrobora com os nossos dados, uma vez que apenas as doses de 0.5 e 1.5 J/cm$^2$, não reduziram a viabilidade dessas células. Em relação aos melanomas, um trabalho mostrou que doses acima de 5 J/cm² foram capazes de diminuir a viabilidade celular

(Izykowska *et al*., 2009), o que difere dos nossos dados, já que 6 J/cm² não alterou a viabilidade da linhagem de melanoma SK-MEL 147, essa diferença pode estar relacionada ao espectro de radiação da lâmpada utilizada nos equipamentos.

A luz UV, corresponde a 6% do espectro de luz solar (Ichihashi *et al*., 2009), porém 95% dos raios ultravioleta que efetivamente chegam a superfície da Terra são do tipo UV-A, isso porque a radiação UV-C é totalmente absorvida pelo oxigênio e pela camada de ozônio da atmosfera, já a radiação UV-B é parcialmente absorvida pelo camada de ozônio da atmosfera e a pequena porcentagem que chega à superfície da Terra é altamente danosa a nossa pele, causando queimaduras (Diffey, 2002). Por esse motivo, escolhemos a radiação UV-A para o nosso estudo, pois além de ser menos danosa, é capaz de atingir as camadas mais profundas da pele, como a camada basal da epiderme e a derme, onde se localizam os melanócitos e melanomas (Devi *et al*., 2015).

A exposição de pessoas a radiação UV depende das variações ambientais locais e também de seus comportamentos, tais como, o uso de filtros solares, roupas escuras e também do tempo que permanecem ao ar livre (Morris *et al*., 1995). Um estudo feito no Reino Unido mostrou que a variação diária de exposição à luz UV-A durante os meses de verão, junho e julho, varia de 20 a 100 J/cm² (Diffey, 2002). Esses dados nos mostram que a dose de irradiação escolhida nesse estudo corresponde a uma condição totalmente branda, sem lesão no DNA ou indução de oncogênes em células da pele, como permanecer pouco tempo sob exposição aos raios UV. Um outro exemplo de que nossa condição é branda é um trabalho que irradiou melanócitos com uma dose de 100 J/cm² para conseguir induzir danos oxidativos no DNA dessas células (Mouret *et al*., 2012).

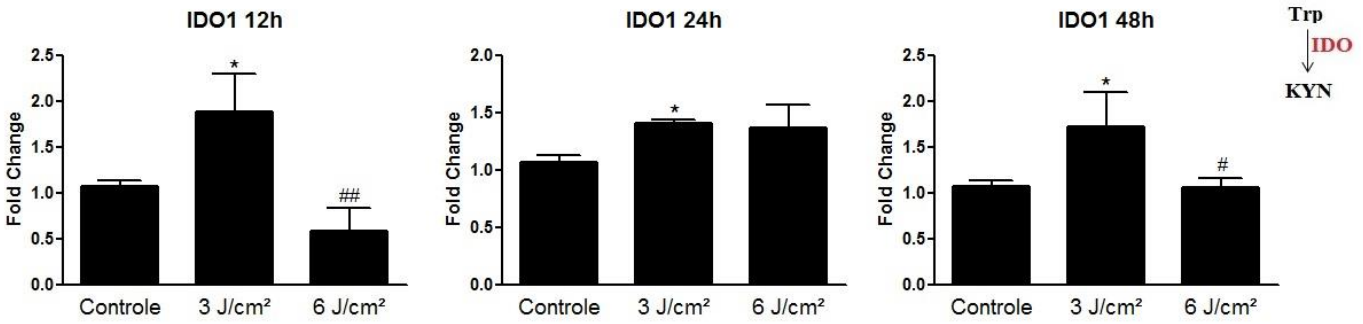
As diferentes camadas da pele possuem um grande número de cromóforos que podem interagir e absorver a luz UV gerando efeitos biológicos positivos ou negativos (Juzeniene and Moan, 2012). É muito comum a radiação UV-A desencadear respostas não enzimáticas, como a ativação da cascata de sinalização de ceramida em queratinócitos após a irradiação, através da indução da expressão de ICAM-1 (Grether-Beck *at al*., 2000) e a melanogênese, induzida através da oxidação da melanina pré-existente, por precursores melanogênicos ou então pelo movimento ascendente de melanossomas em direção à superfície da pele após a radiação UV (Miyamura *et al*., 2007; Coelho *et al*., 2009). O que nós podemos observar nos resultados a seguir é a radiação UV-A induzindo diretamente a expressão de enzimas envolvidas nas rotas catabólicas do Trp, efeito que até então, nunca tinha sido mostrado em células humanas.

## 5.2. Expressão gênica

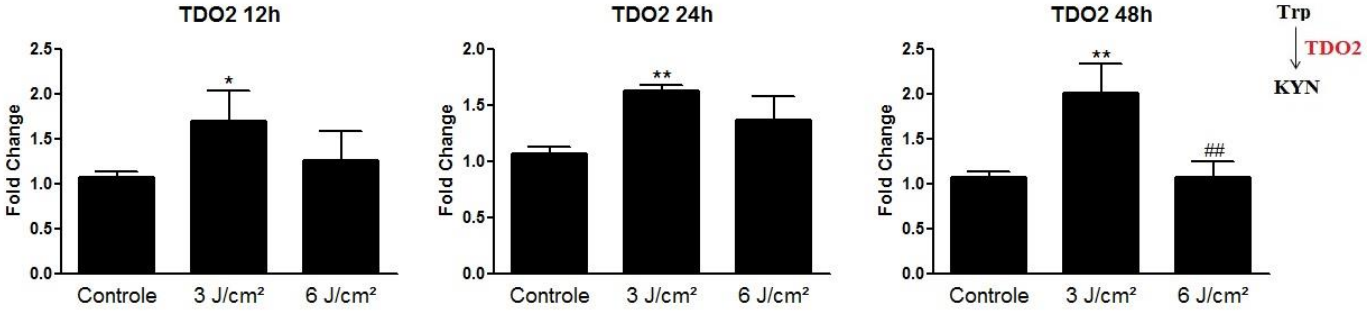
### 5.2.1. Expressão gênica de melanomas após irradiação

A radiação UV-A foi capaz de modificar a expressão gênica de algumas das enzimas envolvidas na via KYN em melanomas (Figura 8). Os nossos resultados mostram que a radiação UV-A aumentou significativamente a expressão de IDO, TDO, KYNU e KMO em melanoma, mostrando que a radiação direciona a via para a produção de KYN, AA, HAA e HK.

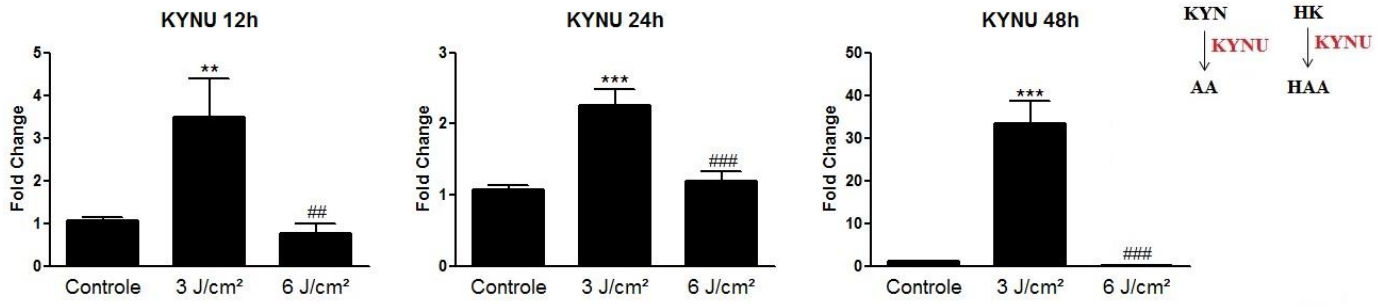
**A**


IDO1 12h
IDO1 24h
IDO1 48h
Fold Change
Controle
3 J/cm²
6 J/cm²
Trp
IDO
KYN

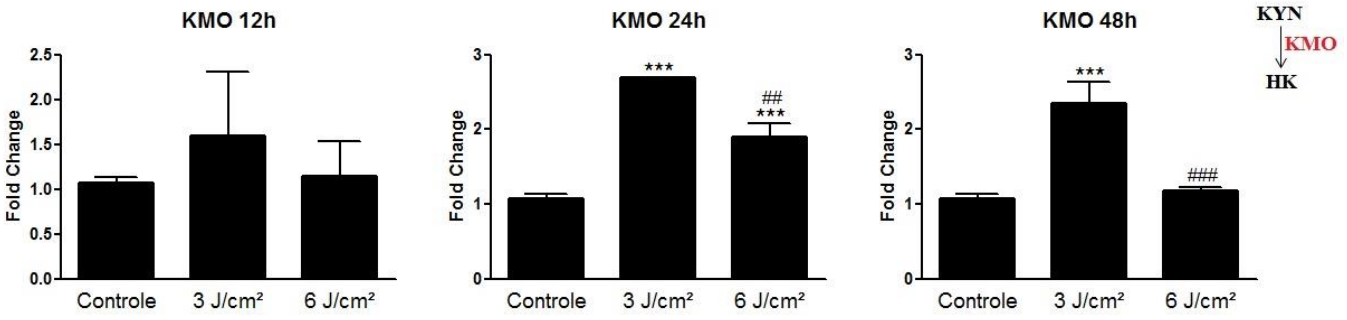
**B**


TDO2 12h
TDO2 24h
TDO2 48h
Fold Change
Controle
3 J/cm²
6 J/cm²
Trp
TDO2
KYN

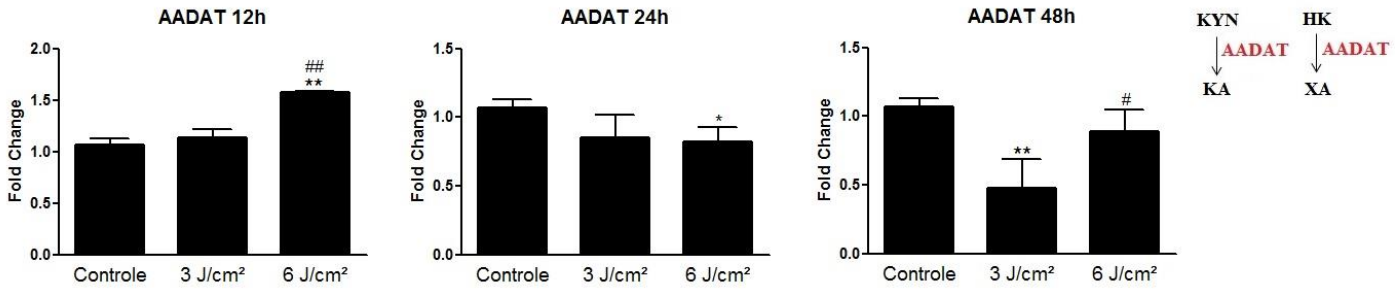
**C**


KYNU 12h
KYNU 24h
KYNU 48h
Fold Change
Controle
3 J/cm²
6 J/cm²
KYN
KYNU
AA
HK
KYNU
HAA

**D**


KMO 12h
KMO 24h
KMO 48h
Fold Change
Controle
3 J/cm²
6 J/cm²
KYN
KMO
HK

**E**




**F**

**G**

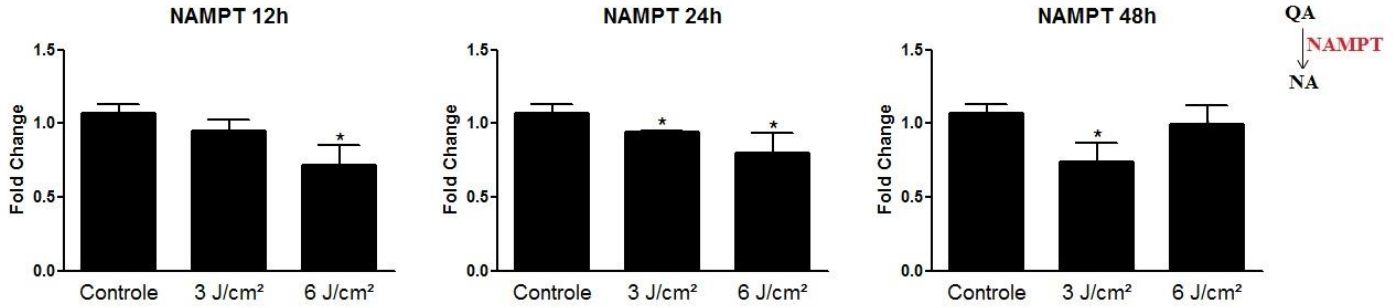



**Figura 8: Expressão gênica de melanomas das enzimas da via KYN por PCR em tempo real. (A)** Expressão de IDO; **(B)** Expressão de TDO2; **(C)** Expressão de KYNU; **(D)** Expressão de KMO; **(E)** Expressão de AADAT; **(F)** Expressão de HAAO; **(G)** Expressão de NAMPT. Expressão das enzimas da via KYN por melanomas (linhagem SK-MEL 147) 12, 24 e 48 horas após a irradiação (3 e 6 J/cm²). O gene GAPDH foi utilizado como calibrador da reação. O método comparativo (2-ΔΔCT) foi utilizado para comparar os níveis de expressão de RNAm. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$ e (***) $P < 0.001$ em relação ao controle; (#) $P < 0.05$, (##) $P < 0.01$ e (###) $P < 0.001$ em relação ao 3J/cm². N.D: o gene foi dosado, porém não foi detectado.

A expressão de IDO tem sido identificada em diversos tipos de tumores (Lecea *et al*., 2016). Sabe-se que a expressão e atividade de IDO, seguida por depleção de Trp e aumento de KYN no microambiente tumoral, induz a inibição da proliferação de linfócitos T ativados e aumento de apoptose dessas células, conduzindo ao imuno escape tumoral (Suzuki *et al*., 2010). Além disso, a diminuição da concentração de Trp

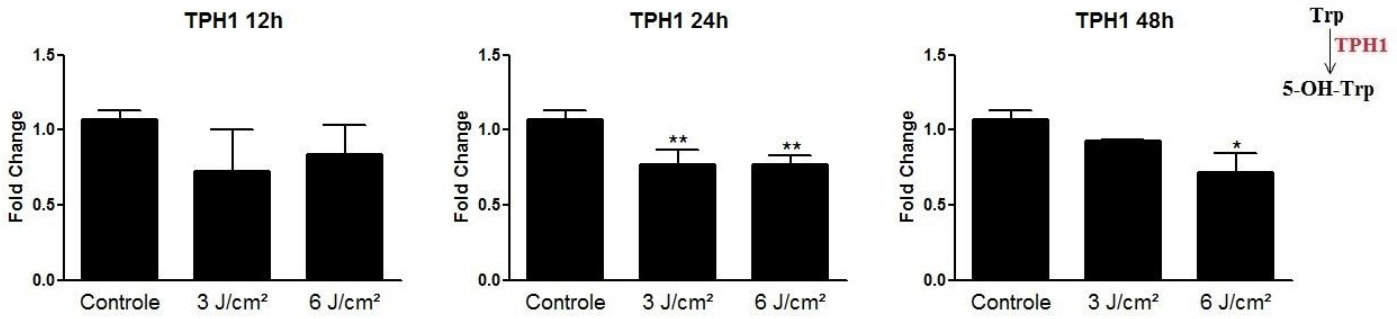
no soro foi associada com mau prognóstico em pacientes com melanoma, e a expressão de IDO por células de melanoma metastático está ligada a uma sobrevivência mais curta, indicando que IDO poderia ser um biomarcador útil para o melanoma (Lecea *et al*., 2016; Speeckaert et al., 2004). Apesar da expressão de IDO ser comum em melanomas, essa expressão foi maior após a radiação, enfatizando que a radiação UV-A poderia contribuir com a progressão tumoral.

Além disso, existem alguns estudos que mostram o benefício da radiação UV no tratamento de algumas doenças de pele, como psoríase e vitiligo (Mudigonda *et al*., 2012), ou ainda no lúpus vulgar, uma condição da pele causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Møller *et al*., 2005). A radiação UV foi o único tratamento eficaz contra bacilos tuberculosos na pele antes da introdução da quimioterapia antituberculosa na década de 1950 (Lawrence, 2002). Porém, com base nos nossos resultados, que mostram aumento da expressão de IDO e TDO após a radiação UV-A, a fototerapia para o tratamento de melanomas pode não ser uma boa opção de tratamento.

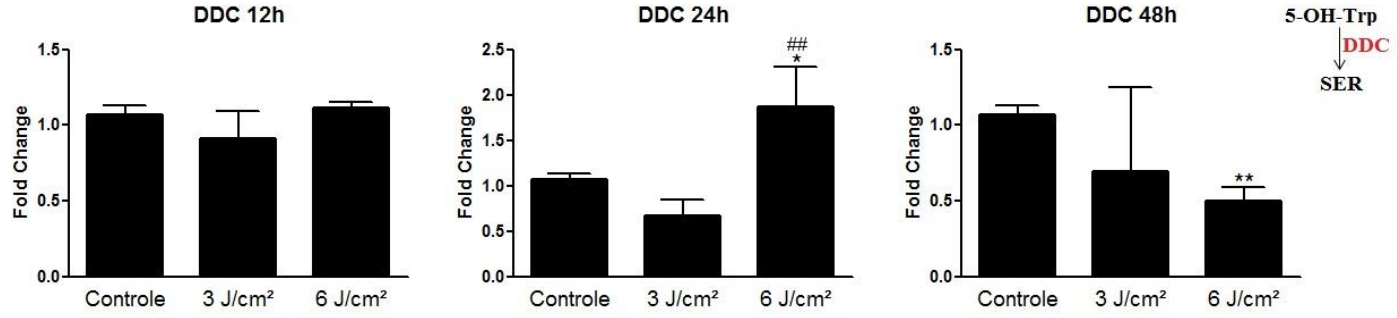
A enzima KYNU, responsável pela conversão de KYN em AA e HAA teve um aumento significativo de 30 vezes após 48 horas de radiação com a dose de 3 J/cm² em melanomas. Esses dois metabólitos já foram descritos e relacionados a outros tipos de tumores, como no câncer de bexiga (Teulings *et al.*, 1973) e além disso, ambos metabólitos podem auto-oxidar e gerar radicais intermediários mutagênicos que, como a KYN, podem interagir com o AhR (Chung e Gadupudi, 2011). Não só KYNU, mas a enzima KMO, responsável pela conversão de KYN em HK também teve um aumento significativo após a radiação UV-A nessas células, o que é muito interessante, uma vez que já foi mostrado aumento de HK após radiação UV-A em melanócitos oculares humanas (Ortwerth *et al*., 2009).

Em relação a via SER em melanomas, após a radiação UV-A a expressão das enzimas TPH1 e ALDH1A2 foi diminuída, já a expressão de DDC teve um aumento após 24 horas da radiação a 6 J/cm² e as enzimas AANAT e HIOMT também tiveram a expressão aumentada após 48 horas da radiação (figura 9).

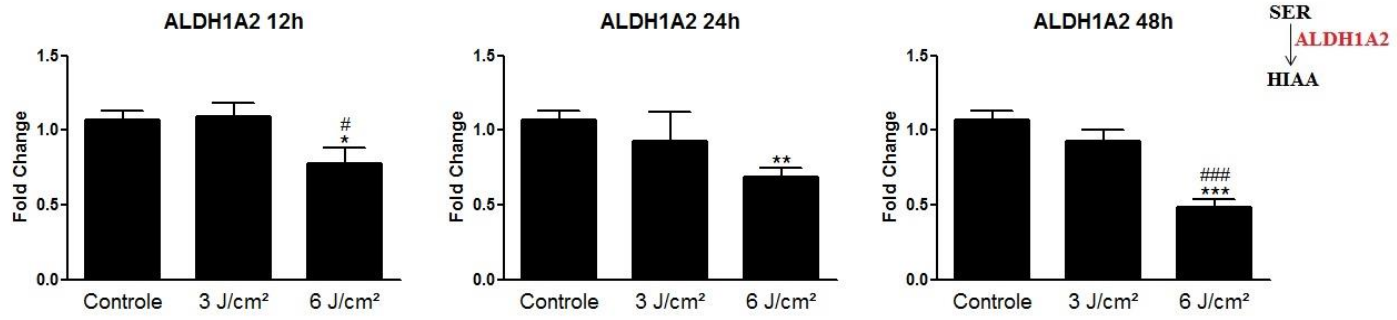
**A**



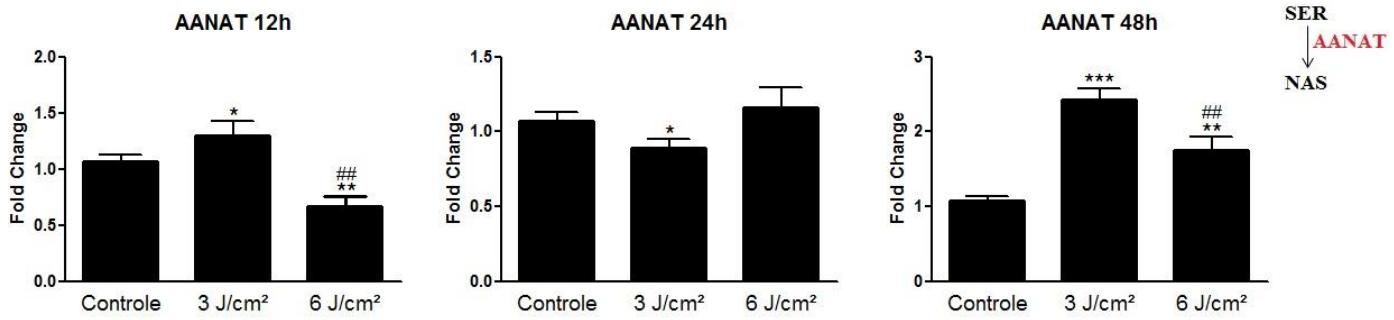

**B**



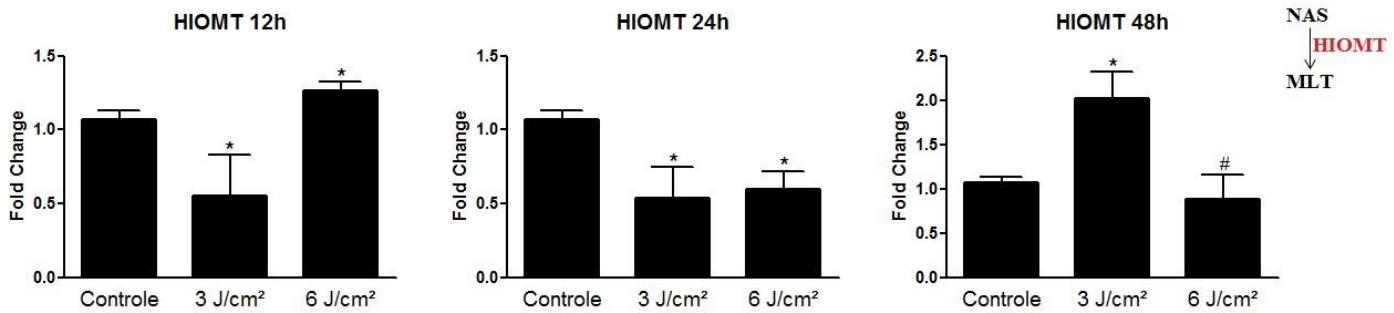

**C**



**D**




**E**




**F**

**Figura 9: Expressão gênica de melanomas das enzimas da via SER por PCR em tempo real. (A)** Expressão de TPH1; **(B)** Expressão de DDC; **(C)** Expressão de ALDH1A2; **(D)** Expressão de AANAT; **(E)** Expressão de HIOMT; **(F)** Expressão de MPO. Expressão das enzimas da via SER por melanomas (linhagem SK-MEL 147) 12, 24 e 48 horas após a irradiação (3 e 6 J/cm²). O gene GAPDH foi utilizado como calibrador da reação. O método comparativo (2-ΔΔCT) foi utilizado para comparar os níveis de expressão de RNAm. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$ e (***) $P < 0.001$ em relação ao controle; (#) $P < 0.05$, (##) $P < 0.01$ e (###) $P < 0.001$ em relação ao 3J/cm². N.D: o gene foi dosado, porém não foi detectado.

A radiação UV-A inibiu a expressão das enzimas AANAT e HIOMT, porém essa inibição foi revertida após 48 horas da radiação, quando essas enzimas aumentaram sua expressão, o que indica a produção de melatonina. Além disso, houve uma

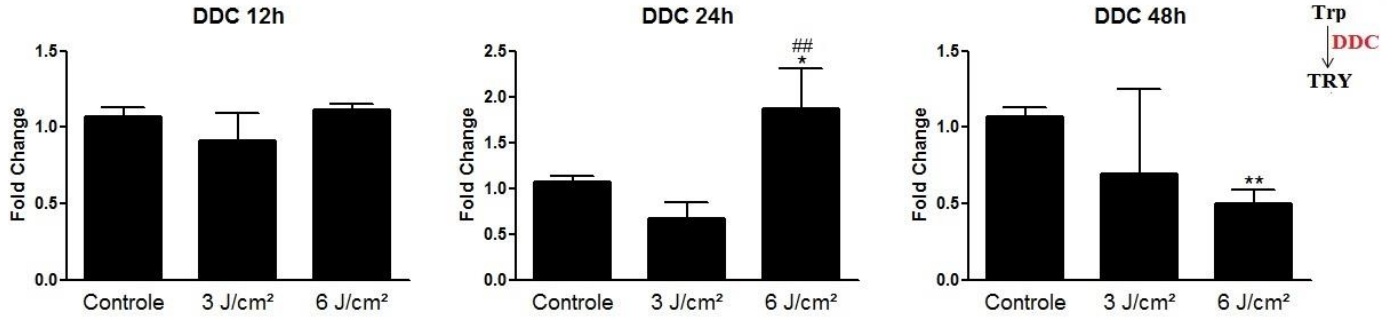
diminuição da expressão de ALDHA1A2 após a radiação, o que faz sentido, já que a radiação direciona a via para a síntese de MLT e não de HIAA.

Já foi descrito que as células da pele são capazes de sintetizar MLT e esta síntese pode ser induzida ou modificada por radiação UV (Kim *et al*., 2015). Além disso, os efeitos fotoprotetores da melatonina já foram descritos, sendo eles a redução do eritema, a proteção contra os danos oxidativos e a prevenção tanto do foto-envelhecimento como da fotocarcinogênese induzidos pelos raios UV (Papagiannidou *et al*., 2014).

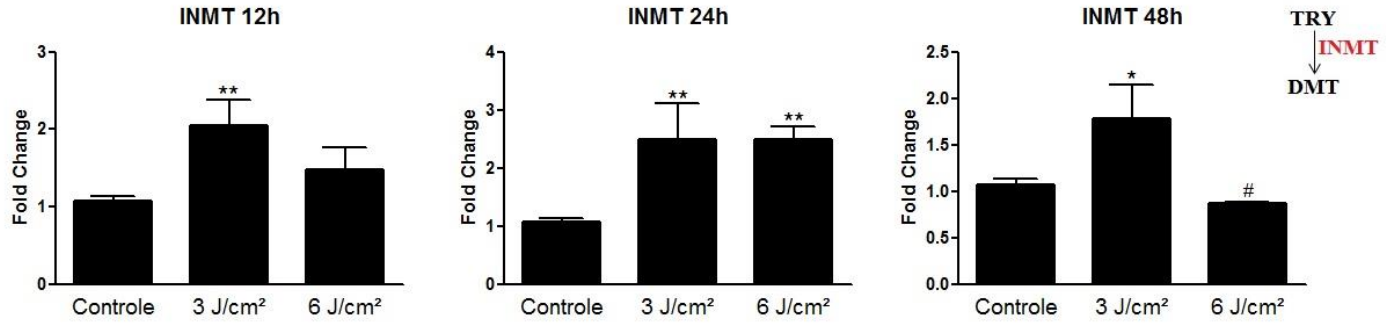
Além disso, após 24 horas da radiação a 6 J/cm² houve aumento de expressão da enzima DDC. Esse resultado é muito interessante se relacionarmos com o bem estar proporcionando pela exposição à luz solar (Sivamani *et al*., 2009), já que essa enzima é responsável pela síntese de serotonina e esse metabólito é conhecido por proporcionar essa sensação.

Na via TRY em melanomas, a radiação UV-A aumentou a expressão da enzima INMT em todos os tempos após a irradiação (12, 24 e 48 horas), já a enzima MAOA, teve a expressão diminuída após a radiação de 6 J/cm² em todos os tempos (figura 10).

**A**



**B**




**C**

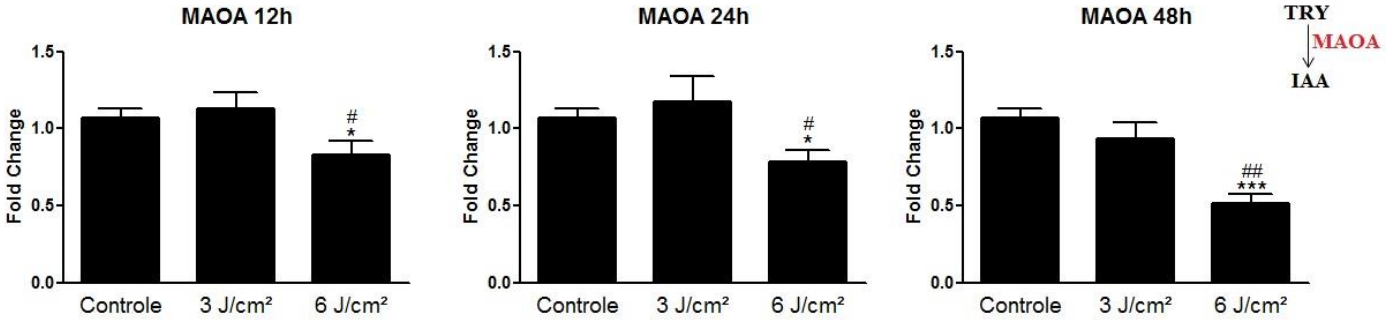



**Figura 10: Expressão gênica de melanomas das enzimas da VIA TRY por PCR em tempo real. (A)** Expressão de DDC; **(B)** Expressão de INMT; **(C)** Expressão de MAOA. Expressão das enzimas da via TRY por melanomas (linhagem SK-MEL 147) 12, 24 e 48 horas após a irradiação (3 e 6 J/cm²). O gene GAPDH foi utilizado como calibrador da reação. O método comparativo (2-ΔΔCT) foi utilizado para comparar os níveis de expressão de RNAm. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$ e (***) $P < 0.001$ em relação ao controle; (#) $P < 0.05$ e (##) $P < 0.01$ em relação ao 3J/cm².

Os nossos resultados mostram que a radiação UV-A direciona a via TRY para a expressão de INMT, responsável pela produção de DMT e o nosso grupo já mostrou que essa linhagem de melanoma é capaz de produzir DMT em condições normais (Gomes *et al*., 2014). O DMT é um potente alucinógeno e apesar da extensa pesquisa em relação aos seus efeitos neuroativos, o papel fisiológico desse metabólito permanece escasso (Szabo *et al*., 2016).

Muitas pessoas descrevem a exposição ao sol em doses não danosas como sendo muito agradável e não só isso, a exposição à luz solar tem sido associada à melhoria da energia e humor (Sivamani *et al*., 2009). Esse efeito pode estar relacionado ao aumento da expressão de INMT e consequente produção de DMT pelas células da pele, já que esse composto proporciona sensação de bem estar (Barbosa *et al*., 2016).

Nós observamos que o aumento da expressão da maioria das enzimas ocorreu na menor condição de radiação (3 J/cm²) e na condição de 6 J/cm² essa expressão foi diminuída, ou seja, uma pequena dose de radiação foi o suficiente para induzir a expressão dessas enzimas. Talvez na condição de 6 J/cm² a expressão seja menor pois apesar da célula estar viável, como vimos no ensaio de MTT, algumas alterações já podem ter ocorrido nessa célula. Além disso, esse fenômeno acontece com maior intensidade após 48 horas da radiação, e pode ser devido a um processo de recuperação da célula também.

### 5.2.2. Expressão gênica de melanócitos após irradiação

A expressão das enzimas da via KYN por melanócitos foi pouco modificada após a radiação UV-A. A enzima IDO teve a expressão diminuída após 48 horas e a expressão da enzima KMO teve um aumento após 12 horas da radiação (figura 11).

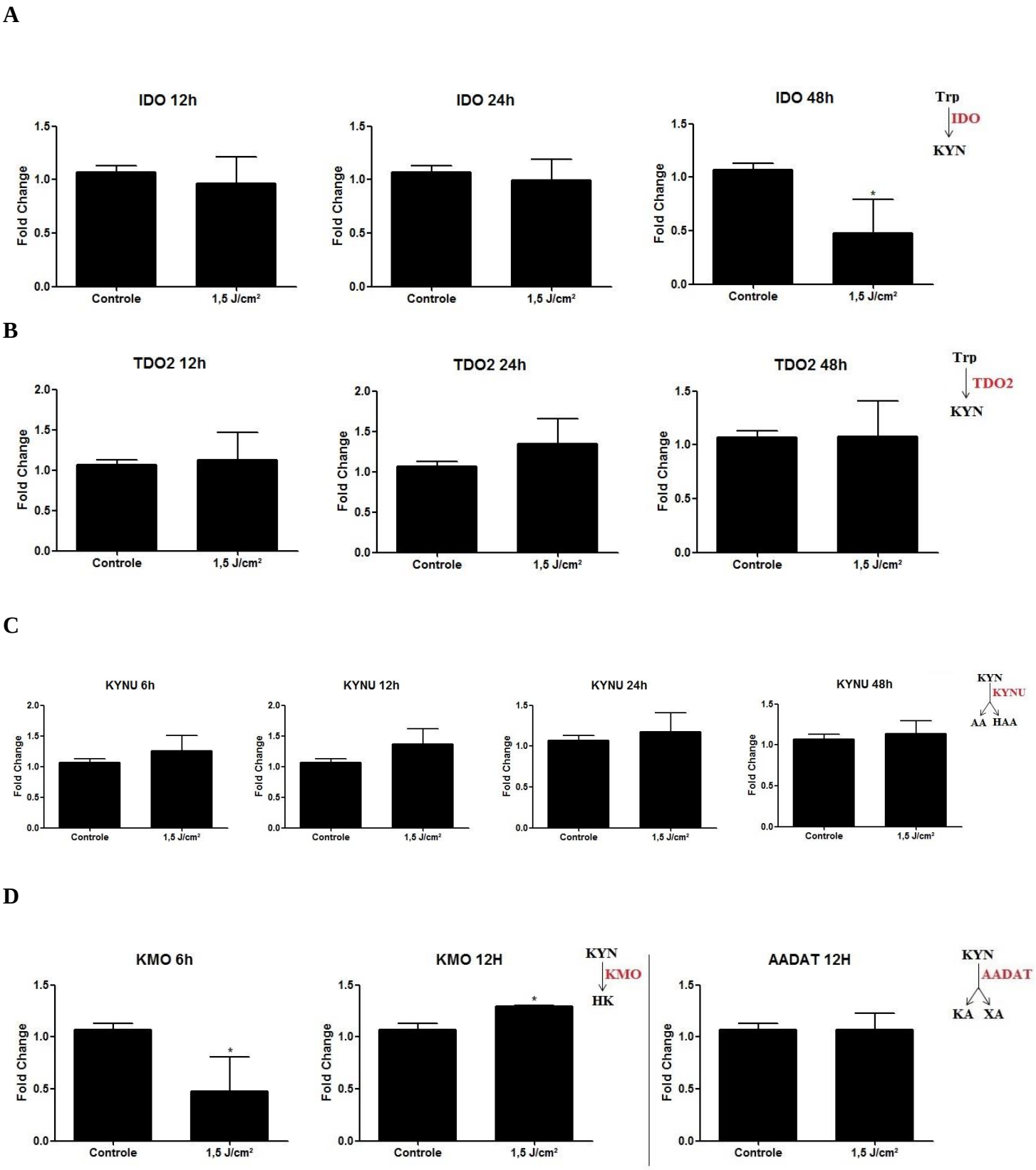


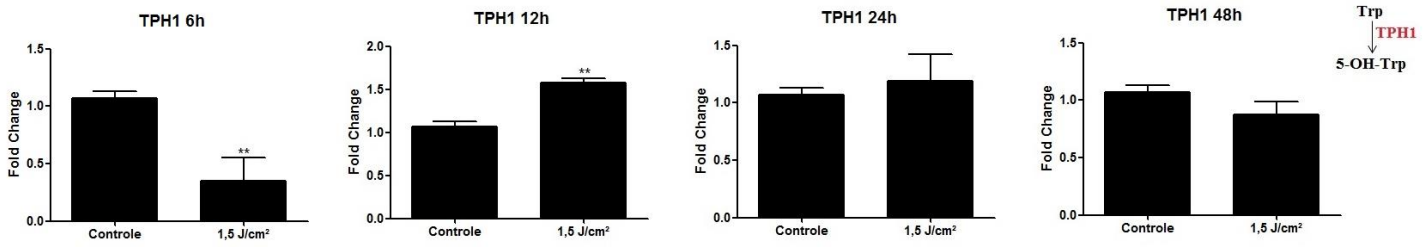

**Figura 11: Expressão gênica de melanócitos enzimas da via KYN por PCR em tempo real. (A)** Expressão de IDO; **(B)** Expressão de TDO2; **(C)** Expressão de KYNU; **(D)** Expressão de KMO e AADAT. Expressão das

enzimas da via KYN por melanócitos 6, 12, 24 e 48 horas após a irradiação (1.5 J/cm²). O gene GAPDH foi utilizado como calibrador da reação. O método comparativo (2-ΔΔCT) foi utilizado para comparar os níveis de expressão de RNAm. (*) $P < 0.05$.

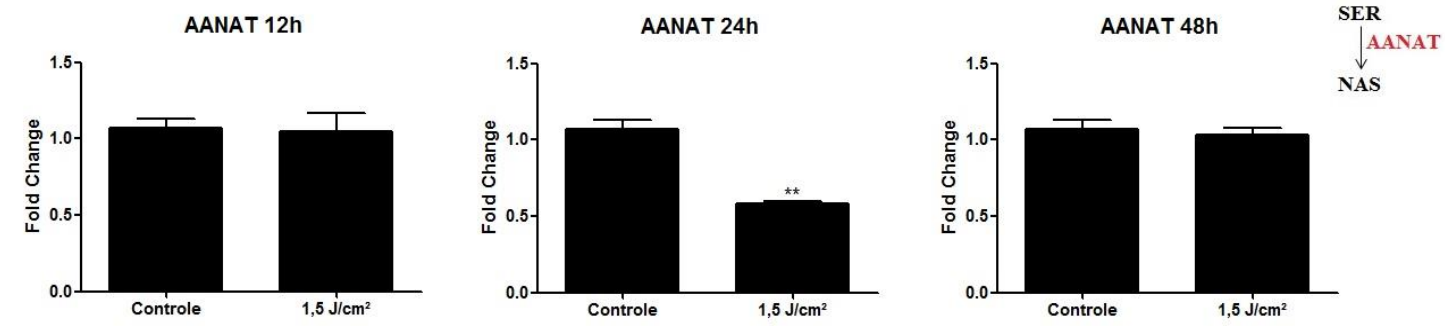
Houve aumento da expressão de KMO, enzima responsável pela conversão de KYN em HK, após 12 horas da radiação UV-A por melanócitos. O único trabalho que relaciona HK com melanócitos foi realizado recentemente pelo nosso grupo, onde foi mostrado que após tratamento com IFN-γ, essas células aumentam a produção de HK (Clara *et al*., 2015). Porém já foi mostrado que HK está presente nas lentes oculares humanas e atua como um filtro físico eficiente contra os raios UV-A (Tsentalovich *et al*., 2011) e além disso, esse metabólito tem sua concentração aumentada após radiação UV-A nessas lentes (Ortwerth *et al*., 2009). Então, o aumento da expressão de KMO após a radiação UV-A, pode estar envolvido com um mecanismo de proteção da célula.

As enzimas envolvidas na via SER também tiveram a expressão pouco modificada após a radiação UV-A em melanócitos. A enzima TPH1 teve a expressão aumentada após 12 horas da radiação (figura 12).

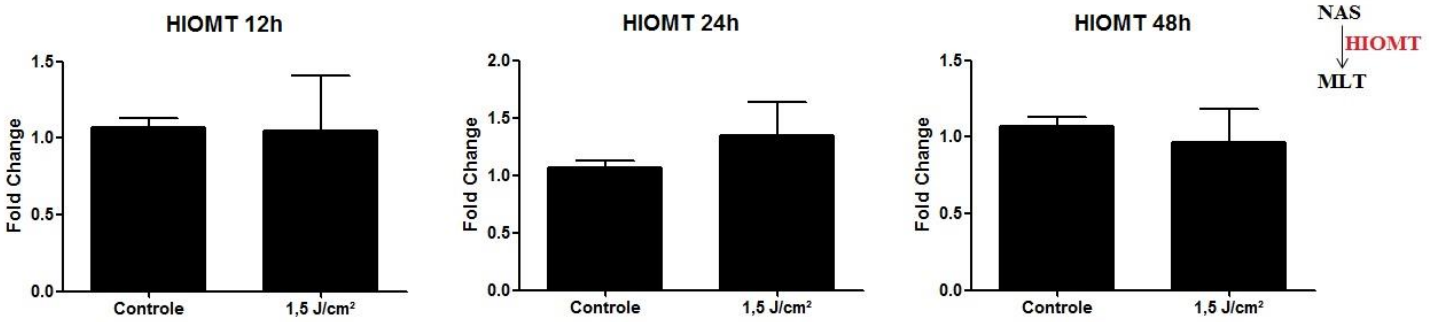
**A**



**B**




**C**




**D**

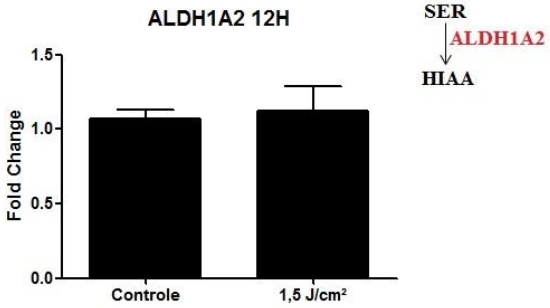



**Figura 12: Expressão gênica de melanócitos enzimas das via SER por PCR em tempo real. (A)** Expressão de TPH1; **(B)** Expressão de AANAT; **(C)** Expressão de HIOMT; **(D)** Expressão de ALDH1A2. Expressão das enzimas da via SER por melanócitos 6, 12, 24 e 48 horas após a irradiação (1.5 J/cm²). O gene GAPDH foi utilizado como calibrador da reação. O método comparativo (2-ΔΔCT) foi utilizado para comparar os níveis de expressão de RNAm. (**) $P < 0.01$.

Uma das nossas hipóteses inicias era de que após a radiação UV-A tivesse um grande aumento da expressão de TPH1, responsável pela síntese de SER, pois acredita-

se que o efeito positivo causado em pacientes com depressão após terapia com luz seja decorrente da síntese de SER na pele. O mesmo poderia ser válido para indivíduos sadios e a afinidade por luz. Porém, apesar de observarmos aumento da expressão da enzima TPH1 após 12 horas de irradiação de melanócitos, esse aumento foi modesto, o que nos leva a pensar que talvez outras células da pele tenham um papel mais relevante nesse contexto ou então que outras condições de radiação possam ser mais eficientes.

Em relação a via TRY, diferente do que vimos para os melanomas, a radiação UV-A diminuiu a expressão de INMT em melanócitos (figura 13).

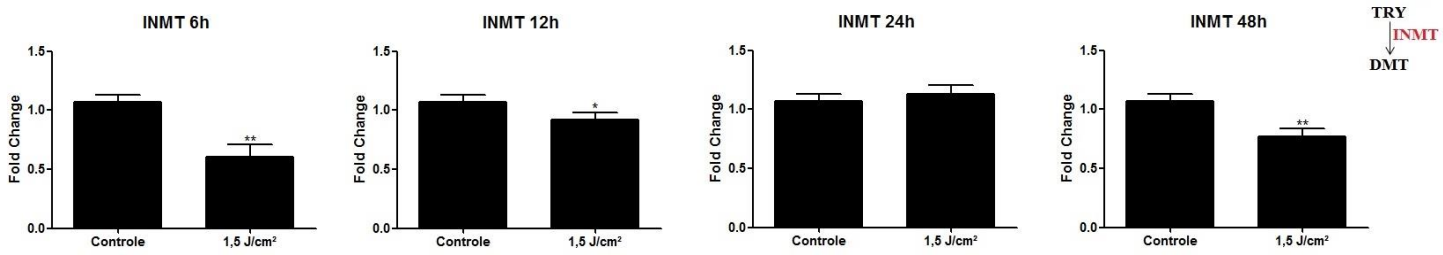



**Figura 13: Expressão gênica de melanócitos da enzima INMT (VIA TRY) por PCR em tempo real.** Expressão da enzima INMT por melanócitos 6, 12, 24 e 48 horas após a irradiação (1.5 J/cm²). O gene GAPDH foi utilizado como calibrador da reação. O método comparativo (2-ΔΔCT) foi utilizado para comparar os níveis de expressão de RNAm. (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$.

Ao observar que as expressões das expressões das enzimas do metabolismo do Trp eram, quando muito, apenas minimamente alteradas em melanócitos, nós testamos um novo tempo após a radiação (6 horas), porém mesmo nesse tempo, não houve aumento de expressão. Isso nos mostra que a célula tumoral tem mais susceptibilidade à luz do que a célula normal.

Alguns trabalhos já mostraram a interação da luz UV-A com melanomas. Sabe-se que a radiação UV induz a formação de danos no DNA na formação do melanoma, porém essa radiação continua causando mutações durante a progressão tumoral (Zhang

*et al*., 2016). Além disso, a radiação UV possui capacidade imunossupressora e promove a progressão do melanoma (Halliday *et al*., 2011).

Recentemente, tem sido mostrada a importância de pacientes com melanoma continuarem se protegendo da radiação solar, não só para se proteger de novos tumores, mas também, para se proteger da progressão tumoral (Kamenisch *et al*., 2016). Porém, as contribuições da radiação UV na progressão do melanoma não são muito claras, embora a radiação UV-A pareça ter uma contribuição significativa (Runger, 2016). Dessa maneira, os nossos dados contribuem para explicar o motivo da radiação UV-A promover a progressão dos melanomas, já que após a radiação houve aumento da expressão de IDO e TDO nessas células, enzimas que estão envolvidas nos mecanismos de progressão e imunoescape tumoral.

Além disso, melanomas e melanócitos possuem respostas diferentes a radiação UV-A, por exemplo, a expressão de IDO é aumentada em melanomas após 48 horas, já em melanócitos essa expressão é diminuída, o mesmo podemos observar para a enzima INMT em todos os tempos.

### 5.2.3. Análise de Microarray

A partir dos resultados obtidos, nós procuramos na base de dados GEO DataSet estudos que realizaram análises de células da pele após radiação UV, buscando alteração no padrão de expressão das enzimas envolvidas nas rotas catabólicas do Trp. Com esta finalidade encontramos um estudo identificado como GSE4066 que serviu de base para o trabalho: Erbb2 Regulates Inflammation and Proliferation in the Skin after Ultraviolet Irradiation. Nesse trabalho os autores utilizaram pele dorsal de ratos

não irradiados e irradiados com luz UV total (30% de UV-A, 70% de UV-B e 1% de UV-C) e o microarray foi feito após 6 horas da radiação.

Obtivemos dados referentes a 13 enzimas de interesse. Dentre estas, observamos aumento na expressão de MPO, NAMPT, KMO, ALDH1A2, TDO e TPH1 quando a pele do dorso de animais radiados é comparada ao controle (figura 14).

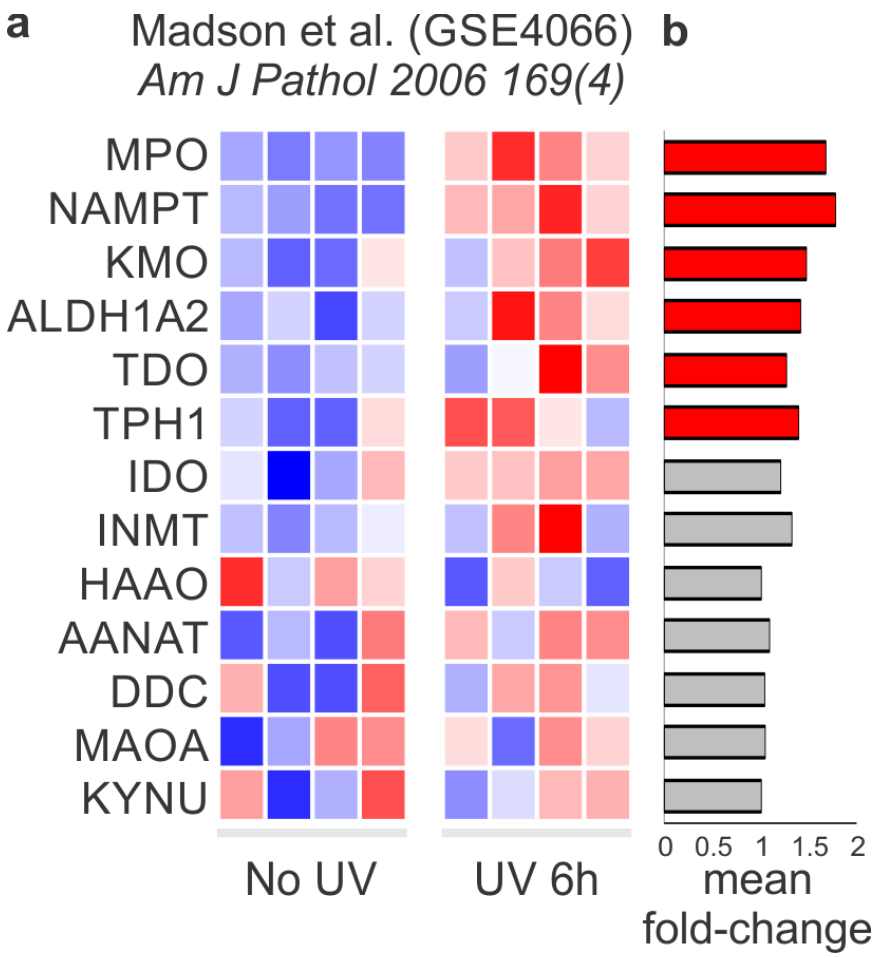



**Figura 14: Expressão das enzimas das vias do Trp.** Expressão de MPO, NAMPT, KMO, ALDH1A2, TDO, TPH1, IDO, INMT, HAAO, AANAT, DDC, MAOA e KYNU na pele do dorso de animais expostos ou não a radiação UV**. (a)** Heatmap representando os valores individuais por cores; **(b)** média fold-change de 4 amostras, sendo que as linhas em vermelho representam os genes com diferença estatística quando comparados ao não irradiado (no UV). O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

Com base nesses resultados, pudemos confirmar que as enzimas envolvidas nas rotas catabólicas do Trp são sensíveis a radiação UV e podem ter sua expressão alterada em células da pele dependendo da radiação.

Como visto anteriormente nos nossos resultados, após a radiação UV-A houve aumento da expressão de KMO e TPH1 em melanócitos. O mesmo podemos observar nesse trabalho, porém além dessas enzimas, outras tiveram aumento de expressão após a radiação, como por exemplo a MPO, que teve um aumento de quase 2 vezes na pele total após a radiação. Esses dados podem confirmar a nossa ideia de que outras células da pele, como queratinócitos ou melanócitos, ou então outras condições de radiação, não apenas os melanócitos e radiação UV-A, tenham um papel mais relevante na produção dos metabólitos do Trp na pele, como a SER.

## 6. Conclusões

Esse trabalho contribuiu para mostrar a capacidade da radiação UV-A em ativar a expressão de enzimas envolvidas nas rotas catabólicas do Trp. A radiação UV-A aumenta a expressão de enzimas que favorecem o crescimento do tumor, como a IDO e TDO. Além disso, a radiação tem a capacidade de diminuir a expressão de algumas enzimas, como a ALDH1A2 em melanomas.

Por outro lado, a exposição à luz solar tem sido associada à melhoria da energia e humor elevado e podemos relacionar esse efeito com o aumento da expressão de INMT por melanomas, já que o composto DMT é conhecido por proporcionar sensação de bem estar.

Além disso, a célula tumoral tem mais susceptibilidade à luz do que a célula normal, isso porque muitas enzimas tiveram a expressão aumentada em melanomas após a radiação, e em melanócitos foram diminuídas ou não tiveram mudanças, por exemplo a enzima INMT. Esse resultado vai de encontro a nossa hipótese inicial, pois esperávamos um aumento grande na expressão de INMT e TPH1 em melanócitos após a radiação, o que justificaria o comportamento de fotofilia. Então, talvez outras células da pele tenham um papel mais relevante nesse contexto ou então outras condições de radiação possam ser mais eficientes.

Até hoje, apenas um trabalho havia mostrado a ativação de uma enzima envolvida nas rotas do Trp por luz, que mostrou que a luz UV é capaz de ativar a expressão e atividade de TDO em bactérias (Brady *et al*., 1973). Dessa maneira, os nossos resultados são muito interessantes, pois muitos nunca haviam sido mostrados em humanos. Então, esse trabalho inaugura uma nova linha de estudo entre luz, pele e

metabolismo, porém para uma conclusão de fato, é fundamental a análise metabolômica. Esforços têm sido direcionados para que a identificação dos metabólitos envolvidos nas rotas catabólicas do Trp seja feita por LC-MS e assim complementaremos esses resultados.

## 7. Referências

AGAR N, HALLIDAY G, BARNETSON R, ANANTHASWAMY H, WHEELER M, et al. The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingeprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenisis. Proceedings of the National Academy os Sciences of the United States of America. 101: 4954-4959, 2004.

BALASURIYA, D. et al. The Sigma-1 Receptor Binds to the Nav1.5 Voltage-gated Na+ Channel with 4-Fold Symmetry. Journal of Biological Chemistry, v. 287, n. 44, p. 37021-37029, Oct 2012. ISSN 0021-9258.

BARBOSA PC, STRASSMAN RJ, DA SILVEIRA DX, et al. psychological and neuropsychological assessment of regular hoasca users. compr psychiatry. 2016 nov;71:95-105.

BARTH, M. C. et al. Kynurenic Acid Triggers Firm Arrest of Leukocytes to Vascular Endothelium under Flow Conditions. Journal of Biological Chemistry, v. 284, n. 29, p. 19189-19195, Jul 17 2009. ISSN 0021-9258.

BARTSCH C, BARTSCH H, KARASEK M. Melatonin in clinical oncology. Neuro Endocrinol Lett, v. 23 Suppl 1, p. 30-8, Apr 2002.

BOSCO, M. C. et al. Macrophage activating properties of the tryptophan catabolite picolinic acid. Developments in Tryptophan and Serotonin Metabolism, v. 527, p. 55-65, 2003 2003. ISSN 0065-2598.

BERNEBURG M, GRETHER-BECK S, KURTEN V, RUZICKA T, BRIVIBA K, et al. Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the protoaging-associated mithocondrial common deletion. The Journal of biological chemistry. 274: 15345-15349, 1999.

BRADY O and FEIGELSON, P. Photoactivation of pseudômona L-tryptophan oxygenase by eléctron ejection from its substrate, L-tryptophan. Arch Biochem Biophys, v. 156, n. 2, p. 7450 50, Jun 1973. ISSN 000309861.

CHUNG, K.-T.; GADUPUDI, G. S. Possible Roles of Excess Tryptophan Metabolites in Cancer. Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 52, n. 2, p. 81-104, Mar 2011. ISSN 0893-6692.

CHIARUGI, A. et al. The NAD metabolome - a key determinant of cancer cell biology. Nature Reviews Cancer, v. 12, n. 11, p. 741-752, Nov 2012. ISSN 1474-175X.

CLARA R, ASSMANN N, MORENO A.C, COIMBRA J, NURENBERGER N, DETTMER-WILDE K, OEFNER P and CAMPA A. Melanocytes are more responsive to IFN-γ and produce higher amounts of kynurenine than melanoma cells. Biol. Chem, 2015.

COELHO SG, CHOI W, BRENNER M, MIYAMURA Y, YAMAGUCHI Y, WOLBER R, et al. Short- and long-term effects of UV radiation on the pigmentation of human skin. J Investig Dermatol Symp Proc 2009; 14:32-5; PMID:19675550

D'ORAZIO J, JARRET S, MARSCH A, LAGREW J and CLEARY L. Melanoma – Epidemiology, genetics and risk factors. Intech open science, 2013.

DEVI S, SINHA R, SINGH R. Malignant melanoma maxila. National Journal of Maxillofacial Surgery. Vol 6. Issue 1. Jun 2015.

DÍAZ-LOBO M, GARCIA-AMORÓS J, FITA I, VELASCO D, GUINOVARTA J, and FERRER J. Selective photoregulation of the activity of glycogen synthase and glycogen phosphorylase, two key enzymes in glycogen metabolism. Org. Biomol. Chem., 2015, 13, 7282.

DIFFEY, B. L. Human exposure to solar ultraviolet radiation. Journal of Cosmetic Dermatology, 1, 124–130, 2002.

DIFFEY, B. L. AND I. E. KOCHEVAR (2007). Basic principles of photobiology. In Photodermatology (Edited by H. W. Lim, H. Honigsmann and J. L. Hawk), pp. 15-27. Informa Healthcare USA, Inc., New York.

DINATALE, B. C. et al. Kynurenic Acid Is a Potent Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand that Synergistically Induces Interleukin-6 in the Presence of Inflammatory Signaling. Toxicological Sciences, v. 115, n. 1, p. 89-97, May 2010. ISSN 1096-6080.

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

FOTOPOULOU C. et al. Systemic Changes of Tryptophan Catabolites via the Indoleamine-2,3-dioxygenase Pathway in Primary Cervical Cancer. Anticancer Research, v. 31, n. 8, p. 2629-2635, Aug 2011. ISSN 0250-7005.

FRUMENTO, G. et al. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. Journal of Experimental Medicine, v. 196, n. 4, p. 459-468, Aug 19 2002. ISSN 0022-1007.

GOBAILLE, S. et al. Xanthurenic acid distribuition, transport, accumulation and release in the rat brain. J Neurochem, v. 105, n. 3, p. 982-93, May 2008.

GOMES, M. et al. B Biosynthesis of N-N-dimethyltryptamine (DMT) in a melanoma cell line and its metabolization by peroxidases. Biochemical Pharmacology. Submetido, 2014.

GRETHER-BECK S, BONIZZI G, SCHMITT-BRENDEN H, et al. Non-enzymatic triggering of the ceramide signaling cascade by solar UVA radiation. The EMBO Journal, vol. 19, no. 21, pp. 5793-5800, 2000.

GUILLEMIN, G. J. et al. Characterization of the kynurenine pathway in human neurons. Journal of Neuroscience, v. 27, n. 47, p. 12884-12892, Nov 21 2007. ISSN 0270-6474.

HALLIDAY GM, BYRNE SN, DAMIAN DL. Ultraviolet A radiation: its role in immunosuppression and carcinogenesis. Semin Cutan Med Surg 2011;30:214e21.

HELFRICH YR, SACHS DL, VOORHEES JJ. Overview of skin aging and photoaging. Dermatol Nurs 2008; 20: 177–84.

HIRATA, F. et al. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonina. J Biol Chem, v. 249, n. 4, p. 1311-3. Feb 1974.

HOOGDUIJN J. et al. Glutamate receptors on human melanocytes regulate the expression. Of MiTF. Pigment Cell Research, v. 19, n. 1, p. 58067, Feb 2006. ISSN 089305785.

HUG D and. HUNTER J. Photoactivation of Urocanase in Pseudomonas putida: Possible Role in Photoregulation of Histidine Metabolism. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, June 1970, p. 874-876.

ICHIHASHI M, ANDO H, YOSHIDA M ET AL. Photoaging of the skin. Anti-Aging Medicine 2009; 6: 46–59.

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

IYENGAR B. Photomodulation of the melanocyte cell cycle by indoleamines. Biol Signals Recept. 1998 Nov-Dec;7(6):345-50.

IZYKOWSKA I, GEBAROWSKA E, GEGIELSKI M, et al. Effect of melatonin on melanoma cells subjected to UVA and UVB radiation in *in vitro* studies. International journal of experimental and clinical pathophysiology and drug research, 2009.

JACOB, M.S; PRESTI, D. E. Endogenous psychoative tryptamines reconsidered: na anxiolytic role for dimethyltryptamine. Medical Hypotheses, v. 64, n. 5, p. 930-937, 2005.

JUHASZ, C. et al. Tryptophan metabolism in breast cancers: molecular imaging and immunohistochemistry studies. Nuclear Medicine and Biology, v. 39, n. 7, p. 926-932, Oct 2012. ISSN 0969-8051.

JULIUS D. (1991) Molecular biology of serotonin receptors. Annu. Rev. Neurosci. 14, 335–360.

JUZENIENE A, MOAN J. Beneficial effects of UV radiation other than via vitamin D production. Dermatoendocrinol. 2012 Apr 1;4(2):109-17.

KAMENISCH Y, BABAN TSA, SCHULLER W, VON THALER A-K, SINNBERG T, METZLER G, BAUER J, et al. UVA-irradiation induces melanoma invasion via enhance Warburg effect. J Invest Dermatol 2016;136:1866e75.

KEMA, I. P., DE VRIES, E. G. E., MUSKIET, F. A. J., et al. Clinical chemistry of serotonin and metabolites. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, v. 747, p. 33-48, 2000.

KESZTHELYI, D.; TROOST, F. J.; MASCLEE, A. A. M. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. Neurogastroenterology and motility, v. 21, n. 12, p. 1239-1249, Dec 2009.

KIM, S. Y., KIM, M. K., KWON, S. B., et al. Tumor apoptosis by indole-3-acetic acid/light in B16F10 melanoma-implanted nude mice. Archives of Dermatological RESEARCH, V. 301(4), P. 319-322, 2009.

KIM, R.; EMI, M.; TANABE, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. Immunology, v. 121, n. 1, p. 1-14, May 2007. ISSN 0019-2805.

KIM TK, LIN Z, TIDWELL WJ, et al. Melatonin and its metabolites accumulate in the human epidermis in vivo and inhibit proliferation and tyrosinase activity in epidermal melanocytes in vitro. Mol Cell Endocrinol 404:1–8, 2015.

LARSSON P, ANDERSSON E, JOHANSSON U, OLLINGER K and INGER R. Ultraviolet A and B affect human melanocytes and keratinocytes differently. A study of oxidative alterations and apoptosis. Experimental dermatology, 2005.

LAWRENCE G. Tools of the trade: the Finsen Light. Lancet 2002; 359:1784; PMID:12049905.

LECEA M, PALOMARES T, KASSAM D, CAVIA N, GEH J, LLANO P, MUÑIZ P, ARMESTO D, MARTINEZ –INDART L, ALONSO –VARONA A. Indoleamine 2,3 dioxygenase as a prognostic and follow -up marker in melanoma. A comparative study with LDH and S100B. Journal of tge european academy of dermatology and venereology, 2016.

LERNER, A. et al. Melatonin in peripheral nerve. Nature, v. 183, p. 1821, Jun. 1959, Jun 1959.

LIN JY, FISHER DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. Nature. 2007;445(7130):843-50.

LISSONI, P. et al. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. Neuro Endocrinal Lett, v. 22, n. 1, p. 45-7, 2001.

LUI, H., ANDERSON, R. Radiation sources and interactions with skin. In: H. Lim, H Honigman, J Kawk, eds. Photo-dermatology. New York e London: Informa Healthcare; 2007: pp. 29-40.

MADSON J, LYNCH D, TINKUM K, PUTTA S, AND HANSEN L. Erbb2 Regulates Inflammation and Proliferation in the Skin after Ultraviolet Irradiation. The American Journal of Pathology, Vol. 169, No. 4, October 2006.

MANDA K. UENO M. ANZAI K. AFMK, a melatonina metabolite, attenuates X-ray-induced oxidative damage to DNA, proteins and lipids in mice. J Pineal Res, v. 42, n. 4, p. 386093, Apr 2007. ISSN 074203098.

MEAD MN. Benefits of sunlight: a bright spot for human health. Environ Health Perspect 2008; 116: A160–7.

MIYAMURA Y, COELHO SG, WOLBER R, MILLER SA, WAKAMATSU K, ZMUDZKA BZ, et al. Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. Pigment Cell Res 2007; 20:2-13; PMID: 17250543.

MOFFETT, J. R.; NAMBOODIRI, M. A. Tryptophan and the immune response. Immunology and cell biology, v. 81, n. 4, p. 247-265, Aug 2003.

MØLLER KI, KONGSHOJ B, PHILIPSEN PA, THOMSEN VO, WULF HC. How Finsen's light cured lupus vulgaris. Photodermatol Photoimmunol Photomed 2005; 21: 118-24; PMID:15888127.

MORENO A.C. et al. The expanding roles of 1-methyl-tryptophan (1-MT): in addition to inhibiting kynurenine production, 10MT activates the synthesis of melatonina in skin cells. FEBS J, v. 280, n. 19, p. 4782092, Oct 2013. ISSN 174204658.

MORRIS J, ELWOOD M. How Effective Are Sun Exposure Modification Programmes? Dunedin, New Zealand: Hugh Adam Cancer Epidemiology Unit, University of Otago, 1995.

MOURET S, FORESTIER A, DOUKI T. he specificity of UVA-induced DNA damage in human melanocytes. Photochem. Photobiol. Sci., 2012, 11, 155–162.

MUDIGONDA T, DABADE TS, FELDMAN SR. A review of targeted ultraviolet B phototherapy for psoriasis. J Am Acad Dermatol 2012; 66:664-72; PMID:22000769.

MULLER A and SCHERLE P. Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors. Nat Rev Cancer, v. 6, n. 8, p. 613-25, Aug 2006. ISSN 1474-175X.

MUNN D and MELLOR A. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. J Clin Invest, v. 117, n. 5, p. 1147-54, May 2007. ISSN 0021-9738.

MUTHUSAMY V, PIVA J. The UV response of the skin: a review of the MAPK, NFkappaB and TNFalpha signal transduction pathways. Archives of dermatological research 302: 5-17, 2010.

NATARAJAN VT, GANJU P, RAMKUMAR A, GROVER R, GOKHALE RS. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. Nature chemical biology 10: 542-551, 2014.

NATARAJAN V, GANJU P, SINGH A. IFN-γ sinaling maintains skin pigmentation homeostasis through regulation of melanosome maturation. PNAS, February 11, 2014. Vol. 111, no. 6, p. 2301-2306.

NEUMEISTER A, PRASCHAK-RIEDER N, BESSELMANN B, RAO ML, GLÜCK J, KASPER S. Effects of tryptophan depletion on drug-free patients with seasonal

affective disorder during a stable response to bright light therapy. Arch Gen Psychiatry. 1997 Feb;54(2):133-8.

NIELSEN KP, ZHAO L, STAMNES JJ et al. The optics of human skin: aspects important for human health. In: E Bjertness, ed. Solar Radiation and Human Health. Oslo: The Norwegian Academy of Science and Letters; 2008: pp. 35–46.

NICKEL A, WOHLRAB W. 2000. Melatonin protects human keratinocytes from UVB irradiation by light absorption. Arch Dermatol Res 292: 366–368.

NORDLIND, K., AZMITIA, E. C., SLOMINSKI, A., et al. The skin as a mirror of the soul: exploring the possible roles of serotonin. Exp Dermatol, v. 17(4), p. 301-311, 2008.

OPITIZ, C. et al. Tryptophan degradation in autoimune diseases. Cell Mol Life Sci, v. 64, n. 19-20, p. 2542-63, Oct 2007.

ORTWERTH B. J et al. Tryptophan metabolites from young human lenses and the photooxidation of ascorbic acid by UVA light. Invest Ophthamol Vis.Sci. 50, 3311, 2009.

OSMOLA-MAŃKOWSKA A, SILNY W, DAŃCZAK-PAZDROWSKA A, OLEK-HRAB K, MAŃKOWSKI B, OSMOLA K, et al. The sun--our friend or foe? Ann Agric Environ Med. 2012;19(4):805-9.

PAPAGIANNIDOU E, SKENE DJ, IOANNIDES C. Potential drug interactions with Melatonin. Physiol Behav. 2014 May 28;131:17-24.

PATHAK MA, RILEY FJ, FITZPATRICK TB, CURWEN WL. Melanin formation in human skin induced by long-wave ultra-violet and visible light. Nature. 1962;193:148-50.

PETERS, J. C. Tryptophan nutrition and metabolism – an overview. Kynurenine and serotonin pathways: progress in tryptophan research, v. 294, p. 345-358, 1991.

PILOTTE, L. 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, v. 109, n. 7, p. 2497-2502, Feb 14 2012. ISSN 0027-8424.

POORMASJEDI-MEIBOD S, et al. Anti-scarring properties of diferente tryptophan derivatives. PLoS One, v. 9, n. 3, p. e91955, 2014. ISSN 193206203.

PRASCHAK-RIEDER N, WILLEIT M, WILSON AA, HOULE S, MEYER JH. Seasonal variation in human brain serotonin transporter binding. Arch Gen Psychiatry 2008. 65:1072–1078.

PURVES D. Neuroscience, ed 4. Chapter Sleep and Wakefulness. Sinauer Associates Inc. Publishers, Massachusetts 2004.

RAMAMOORTHY S, BAUMAN AL, MOORE KR, HAN H, YANG-FENG T, CHANG AS, GANAPATHY V, BLAKELY RD. Antidepressant- and cocainesensitive human serotonin transporter: Molecular cloning, expression, and chromosomal localization. Proc Natl Acad Sci USA 1993. 90:2542–2546.

RAMASUBRAMANIAM R, ROY A, SHARMA B, NAGALAKSHMI S. Are there mechanistic differences between ultraviolet and visible radiation induced skin pigmentation? Photochem Photobiol Sci. 2011;10(12):1887-93.

RAVINDRA, T.; LAKSHMI, N.; AHUJA, Y. Melatonin in pathogenesis and therapy of cancer. Indian J Med Sci, v. 60, n. 12, p. 523-35, Dec 2006. ISSN 0019-5359.

REYNOLDS, W. F. et al. Myeloperoxidase polymorphism is associated with gender specific risk for Alzheimer’s disease. Experimental Neurology, v. 155, n. 1, p. 31-41, Jan 1999.

RIBA, J. et al. Psychometric assessment of the Hallucinogen Rating Scale. Drug Alcohol Depend, v. 62, n. 3, p. 215-23, May 2001. ISSN 0376-8716.

ROSENTHAL NE, SACK DA, GILLIN JC, et al. Seasonal affective disorder. A description of the syndrome and preliminary findings with light therapy. Arch Gen Psychiatry 1984. 41:72–80.

RUDNICK G, CLARK J. From synapse to vesicle: the reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. Biochim Biophys Acta 1993. 1144:249–263.

RUNGER T. M. Mechanisms of Melanoma Promotion by Ultraviolet Radiation. Journal of Investigative Dermatology (2016) 136, 1751e1752.

RYOO YW, SUH SI, MUN KC, KIM BC, LEE KS. 2001. The effects of the melatonin on ultraviolet-B irradiated cultured dermal fibroblasts. J Dermatol Sci 27:162–169.

SEUWEN K, and POUYSSEGUR J. (2001) Serotonin as a growth factor. Biochem. Pharmacol. 39, 985–990.

SAINZ, R. et al. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. Cell Mol Life Svi, v. 60, n. 7, p. 1407-26, Jul 2003.

SCENIHR - Health Effects of Artificial Light. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. European Union, 2012.

SHAH, G. M. et al. Biochemical assessment of niacin deficiency among carcinoid cancer patients. American Journal of Gastroenterology, v. 100, n. 10, p. 2307-2314, Oct 2005.

SILVA, S. et al. Oxidation of melatonin and its catabolites, N1-acetyl-N2 -formyl-5-methoxykynuramine and N1-acetyl-5-methoxykynuramine, by activated leukocytes. J Pineal Res, v. 37, n. 3, p. 171-5, Oct 2004. ISSN 0742-3098.

SIVAMANI R, CRANE LA, DELLAVALLE RP. The benefits and risks of ultraviolet tanning and its alternatives: the role of prudent sun exposure. [vi.]. Dermatol Clin 2009; 27:149-54, vi; PMID:19254658.

SLOMINSKI, A., AND WORTSMAN, J. (2000) Neuroendocrinology of the skin. Endocr. Rev. 21, 457–487.

SLOMINSKI, A., WORTSMAN, J., LUGER, T., PAUS, R., AND SALOMON, S. (2000) Corticotropin releasing hormone and proopiomela- nocortin involvement in the cutaneous response to stress. Physiol. Rev. 80, 979–1020.

SLOMINSKI, A., PISARCHIK, A., SEMAK, I., et al. (2002). The cutaneous serotoninergic/melatoninergic system: securing a place under the sun. FASEB J. 16, 896–898.

SLOMINSKI, A., PISARCHIK, A., JOHANSSON, O., JING, C., SEMAK, I., SLUGOCKI, G., AND WORTSMAN, J. (2003) Tryptophan hydroxylase (TPH) expression in human skin cells. Biochim. Biophys. Acta 1639, 80–86.

SLOMINSKI A and PRUSKI D (1993) Melatonin inhibits proliferation and melanogenesis in rodent melanoma cells. Exp Cell Res 206, 189–194.

SPEECKAERT R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase, a new prognostic marker in sentinel lymph nodes of melanoma patients. European Journal of Cancer, v. 48, n. 13, p. 2004-2011, Sep 2012.

SPEECKAERT R, VERMAELEN K, VAN GEEL N, et al. Indoleamine 2,3 - dioxygenase, a new prognostic marker in sentinel lymph nodes of melanoma patients. Eur J Cancer 2012; 48:2004 -11.

SQUIRES, L. et al. Serotonin catabolism and the formation and fate of 5-hydroxyindole thiazolidine carboxylic acid. J Biol Chem, v. 281, n. 19, p. 13463-70, May 2006.

STEPHEN T, MARIE-CLAUDE F, LESLEY B and COLIN H.. A simple procedure for the photoregulation of chymotrypsin activity. Photochem. Photobiol. Sci., 2006, 5, 326–330.

STONE W, PERKINS N. Quinolinic acid-a potent endogenous excitant at amino-acid receptors in cns. European Journal of Pharmacology, v. 72, n. 4, p. 4110412, 1981. ISSN 001402999.

SUGDEN, D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. CLLEular and Molecular Life Sciences, v. 45(10), p. 922-932, 1989.

SUZUKI Y, SUDA T, FURUHASHI K, et al. Increased serum kynurenine/tryptophan ratio correlates with disease progression in lung cancer. Lung Cancer 2010;67:361 -65.

SZABO A, KOVACS A, RIBA J, DJUROVIC S, RAJNAVOLGYI E, FRECSKA E. The Endogenous Hallucinogen and Trace Amine N,N-Dimethyltryptamine (DMT) Displays Potent Protective Effects against Hypoxia via Sigma-1 Receptor Activation in Human Primary iPSC-Derived Cortical Neurons and Microglia-Like Immune Cells. Front. Neurosci., 14 September 2016.

TEKES, K. HPLC determination of serotonina and its metabolites from human platelet-rich plasma; shift to 5-hydroxytryptophol formation following alcohol consumption. J Chromatogr Sci, v. 46, n. 2, p. 169-73, Feb 2008.

TEULINGS, F. A. et al. Concentration of free and conjugated 3-hydroxyanthranilic acid in urine of bladder tumor patients before and after therapy, measured with an enzymatic method. British Journal of Cancer, v. 27, n. 4, p. 316-322, 1973 1973. ISSN 0007-0920.

TISZLAVICZ, Z. et al. Different inhibitory effects of kynurenic acid and a novel kynurenic acid analogue on tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production by

mononuclear cells, HMGB1 production by monocytes and HNP1-3 secretion by neutrophils. Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology, v. 383, n. 5, p. 447-455, May 2011.

TSENTALOVICH P, SHERIN S, KOPYLOVA V, et al. Photochemical properties of UV Filter molecules of the human eye. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Sep 29;52(10):7687-96.

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

WEINLICH, G. et al. Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients. Dermatology, v. 214, n. 1, p. 8014, 2007.

YOUNG C. Solar ultraviolet radiation and skin cancer. Occup Med 2009; 59: 82–8.

WASMEIER C, HUME AN, BOLASCO G, SEABRA MC. Melanosomes at a glance. J Cell Sci. 2008;121(Pt 24):3995-9.

ZAHER, S. S. et al. 3-Hydroxykynurenine Suppresses CD4(+) T-Cell Proliferation, Induces T-Regulatory-Cell Development, and Prolongs Corneal Allograft Survival. Investigative Ophthalmology & Visual Science, v. 52, n. 5, p. 2640-2648, Apr 2011. ISSN 0146-0404.

ZHANG T, DUTTON-REGESTER K, BROWN KM, HAYWARD NK. The genomic landscape of cutaneous melanoma. Pigment Cell Melanoma Res 2016;29:266e83.

## 8. Anexos

Anexo 1 – Informações para os Membros da Banca Julgadora de Mestrado

Anexo 2 – Currículo lates

Anexo 3 – Ficha do aluno

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**
Secretaria de Pós-Graduação

## Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

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

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

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

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

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

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

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

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

São Paulo, 23 de maio de 2014.

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

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br

Currículo Lattes

Imprimir currículo

# Maysa Braga Barros Silva

Endereço para acessar este CV:http://lattes.cnpq.br/0570027742839426

Última atualização do currículo em 22/12/2016

## Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Farmácia pela Universidade Cruzeiro do Sul com bolsa de iniciação científica por 3 anos (FAPESP 2011/19589-9), atualmente é mestranda em Farmácia, área de Análises Clínicas, Laboratório de Bioquímica Clínica, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP).

**(Texto informado pelo autor)**

## Dados pessoais

**Nome** Maysa Braga Barros Silva

**Filiação** Edson Luis Barros da Silva e Maria Odete Braga

**Nascimento** 16/02/1993 - São Paulo/SP - Brasil

**Carteira de Identidade** 492213513 SSP - SP - 30/09/2010

**CPF** 420.728.748-58

## Formação acadêmica/titulação

**2015** Mestrado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Efeitos da luz sobre o metabolismo do triptofano em células da pele
Orientador: Profa. Dra. Ana Campa
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

**2011 - 2014** Graduação em Farmácia.
Universidade Cruzeiro do Sul, UNICSUL, Sao Paulo, Brasil
Título: Efeito dos ácidos oleico e linoleico em feridas cutâneas
Orientador: Profa. Dra. Elaine Hatanaka
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

**2008 - 2010** Ensino Profissional de nível técnico .
Colégio Paschoal Dantas, CPD, Brasil, Ano de obtenção: 2010

## Formação complementar

**2012 - 2012** Extensão universitária em Vivência Profissional na Farmácia Escola. (Carga horária: 300h).
Universidade Cruzeiro do Sul, UNICSUL, Sao Paulo, Brasil

## Atuação profissional

**1. Universidade Cruzeiro do Sul - UNICSUL**

**Vínculo institucional**

**2011 - 2014** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Aluno pesquisador, Regime: Dedicação exclusiva

**2. Universidade de São Paulo - USP**

**Vínculo institucional**

**2015 - Atual** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Aluno pesquisador , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

## Áreas de atuação

1. Bioquímica
2. Fiosiopatologia
3. Biologia Molecular

## Idiomas

**Inglês** Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

**Português** Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

## Producão

Produção bibliográfica

### Artigos completos publicados em periódicos

1. doi SANTOS, VINICIUS CONEGLIAN; SIERRA, ANA PAULA RENNO; OLIVEIRA, RODRIGO; CAÇULA, KIM GUIMARÃES; MOMESSO, CÉSAR MIGUEL; SATO, FABIO TAKEO; **SILVA, MAYSA BRAGA BARROS**; OLIVEIRA, HELOISA HELENA; PASSOS, MARIA ELIZABETH PEREIRA; DE SOUZA, DIEGO RIBEIRO; GONDIM, OLIVIA SANTOS; BENETTI, MARINO; LEVADA-PIRES, ADRIANA CRISTINA; GHORAYEB, NABIL; KISS, MARIA AUGUSTA PEDUTI DAL MOLIN; GORJÃO, RENATA; PITHON-CURI, TÂNIA CRISTINA; CURY-BOAVENTURA, MARIA FERNANDA
Marathon Race Affects Neutrophil Surface Molecules: Role of Inflammatory Mediators. Plos One. JCR, v.11, p.e0166687 - , 2016.

### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. BORGES, L. S.; PASSOS, M. E.; **BRAGA, M. B. S.**; CONEGLIAN, V.; MOMESSO, C. M.; PITHON-CURI, T. C.; GORJAO, R.; Hatanaka E.
Efeito do treinamento com dança sobre o estado inflamatório de indivíduos diabéticos In: Semana Nacional de Ciência e Tecnologia, 2015, São Paulo.
**Semana Nacional de Ciência e Tecnologia**. , 2015.

2. Hatanaka E.; Weimann E; **BRAGA, M. B. S.**; MURATA, G. M.; DERMARGOS, A.
Effect of palmitoleic acid on the signaling mechanisms involved in the inflammatory phase of wound healing In: 40th FEBS Congress, 2015, Berlin.
**40th FEBS Congress**. , 2015.

3. Bachi, A; SANTOS, V. C.; MOMESSO, C. M.; PASSOS, M. E.; **BRAGA, M. B. S.**; GUTIERREZ, F.; SIERRA, A. P.; CURY-BOAVENTURA, M. F.; GORJAO, R.; PITHON-CURI, T. C
Fish oil supplementation rich in DHA or EPA modulates the inflammatory response induced by a half-marathon In: 12th ISEI Symposium, 2015, Vienna.
**12th ISEI Symposium**. , 2015.

4. BELMIRO, B. D.; DERMARGOS, A.; Braga MO; **BRAGA, M. B. S.**; FRANCI, M.; Hatanaka E.
Efeito da amilóide sérica A em queratinócitos In: XLIII Encontro de Iniciação Cientifica, 2014, São Paulo.
**ENIC**. Andre, 2014.

5. CURY-BOAVENTURA, M. F.; SANTOS, V. C.; CACULA, K. G.; MOMESSO, C. M.; SATO, F. T.; **BRAGA, M. B. S.**; ALVES, H. H. O.; SANTOS, O. G.; SIERRA, A. P.; BENETTI, M.; KISS, M. A. P. D. M.; PITHON-CURI, T. C.; GORJAO, R.
Effect of marathon race on adheseon molecules and apoptosis receptors of neutrophils. In: 19th Annual Congress of the European college of sport science, 2014, Amsterdã.
**19th Annual Congress of the European college of sport science**. , 2014.

6. Bachi, A; CONEGLIAN, V.; PASSOS, M. E.; **BRAGA, M. B. S.**; GUTIERREZ, F.; CACULA, K.; MOMESSO, C. M.; SATO, F. T.; SIERRA, A. P.; BOAVENTURA, M. F. C.; GORJAO, R.; PITHON-CURI, T. C.
Fish Oil supplementation rich in DHA reduces neutrophil apoptosis and cytokine concentration after a half-marathon. In: XXXIX Congresso of the brazilian society of immunology, 2014, Búzios-Rio de Janeiro.
**XXXIX Congresso of the brazilian society of immunology**. , 2014.

7. CACULA, K. G.; SANTOS, V. C.; MOMESSO, C. M.; SATO, F. T.; MURATA, G. M.; **BRAGA, M. B. S.**; ALVES, H. H. O.; PASSOS, M. E.; LEVADA-PIRES, A. C; CURY-BOAVENTURA, M. F; GORJAO, R.; PITHON-CURI, T. C
Modulation of neutrophil function by moderate aerobic exercise in eutrophic and overweight In: American College of Sports Medicine, 2014, Orlando.
**American College of Sports Medicine**. , 2014.

8. **BRAGA, M. B. S.**; MURATA, G. M.; Weimann E; Braga MO; Curi, R.; Hatanaka E.
Estudo da ação antimicrobiana dos ácidos oleico, linoleico, gama-linolênico, EPA, DHA e palmitoléico em feridas cutâneas In: XVII Encontro de Iniciação Cientifíca, 2013, São Paulo.
**ENIC**. , 2013.

9. **BRAGA, M. B. S.**; MURATA, G. M.; Weimann E; Braga MO; Curi, R.; Hatanaka E.
Topical antimicrobial activity of EPA, DHA, oleic, linoleic, linolenic and palmitoleic acids in wounds In: XLII Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2013, Foz do Iguaçu.
**The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society**. , 2013.

10. Weimann E; MURATA, G. M.; BORTOLON, J.R.; **BRAGA, M. B. S.**; Curi, R.; Hatanaka E.
Topical macadamia oil and palmitoleic acid accelerate wound healing phases. In: 11th World Congress on Inflammation and XXXVIII Immuno, 2013, Natal.
**11th World Congress on Inflammation and XXXVIII Immuno**. , 2013.

11. **BRAGA, M. B. S.**; MURATA, G. M.; Weimann E; Braga MO; Curi, R.; Hatanaka E.
Topical antimicrobial activity of EPA, DHA, oleic, linoleic, linolenic and palmitoleic acids in wounds In: VIII Symposium on Lipids and Health, 2012, São Paulo.
**VIII Symposium on Lipids and Health**. , 2012.

12. **BRAGA, M. B. S.**; MURATA, G. M.; Weimann E; Braga MO; Curi, R.; Hatanaka E.
Topical antimicrobial activity of EPA, DHA, oleic, linoleic, linolenic and palmitoleic acids in wounds In: 6th Congress of the International Society of Nutrigenetics / Nutrigenomics, 2012, São Paulo.
**6th Congress of the International Society of Nutrigenetics / Nutrigenomics**. , 2012.

13. **BRAGA, M. B. S.**; MURATA, G. M.; Weimann E; Braga MO; Curi, R.; Hatanaka E.
Topical antimicrobial activity of oleic and linoleic acids in wounds In: 10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro.
**International Congress on Cell Biolog**. , 2012.

14. Weimann E; MURATA, G. M.; BORTOLON, J.R.; **BRAGA, M. B. S.**; Curi, R.; Hatanaka E.
Topical macadamia oil and palmitoleic acid accelerate wound healing phases. In: VIII Simpósio de Lipideos e Saúde, 2012, São Paulo.
**VIII Simpósio de LIpídeos e Saúde**. , 2012.

### Apresentação de trabalho e palestra

1. BORGES, L. S.; PASSOS, M. E.; **BRAGA, M. B. S.**; CONEGLIAN, V.; MOMESSO, C. M.; PITHON-CURI, T. C.; GORJAO, R.; Hatanaka E.
**Efeito do treinamento com dança sobre o estado inflamatório de indivíduos diabéticos**, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

2. **BRAGA, M. B. S.**; MURATA, G. M.; Weimann E; Braga MO; Hatanaka E.
**Atividade antimicrobiana dos ácidos oleico, linoleico, palmitoléico, EPA, DHA e linolênico em feridas cutâneas**, 2013. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

3. **BRAGA, M. B. S.**; MURATA, G. M.; Weimann E; Braga MO; Hatanaka E.
**Topical antimicrobial activity of EPA, DHA, oleic, linoleic, linolenic and palmitoleic acids in wounds**, 2013. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

4. **BRAGA, M. B. S.**; MURATA, G. M.; Weimann E; Braga MO; Hatanaka E.
**Topical antimicrobial activity of EPA, DHA, oleic, linoleic, linolenic and palmitoleic acids in wounds**, 2012. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

5. **BRAGA, M. B. S.**; MURATA, G. M.; Weimann E; Braga MO; Hatanaka E.
**Topical antimicrobial activity of EPA, DHA, oleic, linoleic, linolenic and palmitoleic acids in**

**wounds**, 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

6. **BRAGA, M. B. S.**; MURATA, G. M.; Weimann E; Braga MO; Hatanaka E.
**Topical antimicrobial activity of oleic and linoleic acids in wounds**, 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Educação e Popularização de C&T

### Curso de curta duração ministrado

1. **BRAGA, M. B. S.**
**XI Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular**, 2016. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Produção técnica

### Demais produções técnicas

1. **BRAGA, M. B. S.**
**XI Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular**, 2016. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

## Eventos

Eventos

### Participação em eventos

1. **II International symposium on pathophysiology and toxicology and VII Simpósio de pós-graduação em Análises Clínicas - SIMPAC**, 2016. (Simpósio)
.
2. **Uoft-USP Workshop on Cancer, Inflammation and Immunity**, 2016. (Outra)
.
3. **XV Simpósio de biossegurança e segurança química e biológica em instituições dede ensino**, 2016. (Simpósio)
.
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Semana Nacional de Ciência e Tecnologia**, 2015. (Congresso)
Efeito do treinamento com dança sobre o estado inflamatório de indivíduos diabéticos.
5. **VI Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas - SIMPAC and I International Symposium on Pathophysiology and Toxicology**, 2015. (Simpósio)
.
6. **IX Simpósio Lipídeos e Saúde**, 2014. (Simpósio)
.
7. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XLII Reunião Anual da SBBq**, 2013. (Congresso)
Topical antimicrobial activity of EPA, DHA, oleic, linoleic, linolenic and palmitoleic acids in wounds.
8. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVII Encontro de Iniciação Científica**, 2013. (Congresso)
Atividade antimicrobiana dos ácidos oleico, linoleico, palmitoléico, EPA, DHA e linolênico em feridas cutâneas.
9. Apresentação de Poster / Painel no(a) **6th Congress of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics (ISNN)**, 2012. (Congresso)
TOPICAL ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF OLEIC AND LINOLEIC ACIDS IN WOUNDS.
10. Apresentação de Poster / Painel no(a) **SBBC - 10th International Congress on Cell Biology**, 2012. (Congresso)
TOPICAL ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF OLEIC AND LINOLEIC ACIDS IN WOUNDS.
11. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VIII-Simpósio de Lipideos e Saúde**2012 ,. (Simpósio)
Topical antimicrobial activity of EPA, DHA, oleic, linoleic, linolenic and palmitoleic acids in wounds.
12. **VII Symposium on Lipids and Health**, 2011. (Simpósio)
.

## Bancas

Bancas

### Participação em banca de comissões julgadoras

### Outra

1. **II International symposium on pathophysiology and toxicology and VII Simpósio de pós-graduação em análises clínicas - SIMPAC**, 2016
Universidade de São Paulo

## Outras informações relevantes

1

**Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 11/01/2017 às 16:22:07.**

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

**9136 - 9229404/1 - Maysa Braga Barros Silva**

| | |
|---|---|
| **Email:** | maysabraga@usp.br |
| **Data de Nascimento:** | 16/02/1993 |
| **Cédula de Identidade:** | RG - 49.221.351-3 - SP |
| **Local de Nascimento:** | Estado de São Paulo |
| **Nacionalidade:** | Brasileira |
| **Graduação:** | Farmácia - Universidade Cruzeiro do Sul - São Paulo - Brasil - 2014 |

| | |
|---|---|
| **Curso:** | Mestrado |
| **Programa:** | Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) |
| **Área:** | Análises Clínicas |
| **Data de Matrícula:** | 06/02/2015 |
| **Início da Contagem de Prazo:** | 06/02/2015 |
| **Data Limite para o Depósito:** | 07/08/2017 |
| **Orientador:** | Prof(a). Dr(a). Ana Campa - 06/02/2015 até o presente. Email: anacampa@usp.br |
| **Proficiência em Línguas:** | Inglês, Aprovado em 06/02/2015 |
| **Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** | Aprovado em 21/03/2016 |
| **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 06/02/2015 |

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).
**Última ocorrência:** Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2016
**Impresso em:** 11/01/2017 16:13:09

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

**9136 - 9229404/1 - Maysa Braga Barros Silva**

| Sigla | Nome da Disciplina | Início | Término | Carga Horária | Cred. | Freq. | Conc. | Exc. | Situação |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FBC5793-12/2 | Tópicos em Análises Clínicas I | 03/03/2015 | 16/06/2015 | 15 | 1 | 100 | A | N | Concluída |
| QBQ5888-1/1 | Tópicos em Metabolismo (Instituto de Química - Universidade de São Paulo) | 19/05/2015 | 13/07/2015 | 120 | 8 | 100 | A | N | Concluída |
| FBC5757-6/2 | Tópicos em Análises Clínicas II | 04/08/2015 | 16/11/2015 | 15 | 1 | 100 | A | N | Concluída |
| FBC5780-2/3 | Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas | 10/08/2015 | 21/09/2015 | 90 | 6 | 88 | B | N | Concluída |
| QBQ5715-8/1 | Planejamento de Aulas Práticas de Bioquímica e Biologia Molecular (Instituto de Química - Universidade de São Paulo) | 18/08/2015 | 09/11/2015 | 120 | 8 | 80 | A | N | Concluída |
| FBC5748-4/2 | Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação | 05/04/2016 | 17/05/2016 | 60 | 4 | 90 | A | N | Concluída |

| | Créditos mínimos exigidos | | Créditos obtidos |
|---|---|---|---|
| | Para exame de qualificação | Para depósito da dissertação | |
| **Disciplinas:** | 0 | 25 | 28 |
| **Estágios:** | | | |
| **Total:** | 0 | 25 | 28 |

**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 18/07/2016

**Impresso em:** 11/01/2017 16:13:17