

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

Ação de metabólitos da via das triptaminas em linhagens de  
melanomas

Janine Baptista Coimbra

São Paulo

2015

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

Ação de metabólitos da via das triptaminas em linhagens de  
melanomas

Janine Baptista Coimbra

Tese para obtenção do grau de DOUTOR  
Orientador: Profa. Dra. Ana Campa

São Paulo

2015

**Ficha Catalográfica**

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

Coimbra, Janine Baptista

C679p    Ação de metabólitos da via das triptaminas em linhagens de  
melanomas / Janine Baptista Coimbra. -- São Paulo, 2015.  
187p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas  
e Toxicológicas.

Orientador: Campa, Ana

1. Bioquímica clínica
2. Química clínica
3. Metabólitos
4. Melanoma I. T. II. Campa, Ana, orientador.

616.0756 CDD

Janine Baptista Coimbra

Ação de metabólitos da via das triptaminas em linhagens de melanomas

Comissão julgadora  
da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Ana Campa  
Orientador/Presidente

---

1º Examinador

---

2º Examinador

---

3º Examinador

---

4º Examinador

São Paulo, \_\_\_\_de\_\_\_\_\_de 2015.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê. ”*

*Arthur Schopenhauer*

*Sonhe com aquilo que você quer ser,  
porque você possui apenas uma vida  
e nela só se tem uma chance  
de fazer aquilo que quer.*

*Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.  
Dificuldades para fazê-la forte.  
Tristeza para fazê-la humana.  
E esperança suficiente para fazê-la feliz.*

*As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas.  
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades  
que aparecem em seus caminhos.*

*A felicidade aparece para aqueles que choram.  
Para aqueles que se machucam  
Para aqueles que buscam e tentam sempre.  
E para aqueles que reconhecem  
a importância das pessoas que passaram por suas vidas.*

Clarice Lispector

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a minha amada família, em especial meus pais Jane e Roner, por terem sempre permanecido ao meu lado, me incentivando a percorrer este caminho.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida e, por dar-me forças nos momentos de fraqueza, guiando-me por esta longa caminhada.

A chefa por ter me acolhido no lab, por passar horas discutindo resultados e experimentos e por fazer eu me apaixonar pela ciência.

Aos colegas do lab de bioquímica Sika, Luzi, Fran, Edson, Silvana, Carol, Ale e a todas estagiárias que tive oportunidade de conhecer e conviver.

Aos amigos Renan, Ariane, Branks e Maysa, integrantes do grupo W, do qual tenho muito orgulho de participar. Obrigada pela ajuda, discussões científicas, risadas, cantorias ao longo de todos os anos de pós-graduação...Mais do que um título, no mestrado/doutorado tive a oportunidade de conhecer vocês, não tenho palavras para expressar a minha gratidão por tudo que fizeram por mim...foram dias e dias acordando cedo e saindo tarde do lab, finais de semanas sem descanso, reuniões que não tinham fim para interpretar resultados malucos, cronogramas e mais cronogramas a serem seguidos para dar conta de fazer todos os experimentos e vocês sempre lá, disposto a ajudar no que era preciso. E por mais estressante que fossem alguns momentos, por maior que fosse a vontade de jogar tudo para o ar, sempre um de vocês estava lá para falar: CALMA JANIS, está acabando rs. Essa conquista é nossa, esse título é nosso...porque somos O GRUPO. AMO VOCÊS GRUPO W!

A todos os professores colaboradores que tornaram possível a realização deste trabalho: em especial prof. Ernani Pinto Junior.

Ao Felipe massas pelo apoio técnico-científico.

As colegas da casa das 7 mulheres: Ale, Dani, Eliana, Georgia, Bruna e todas as outras.

Aos meus amigos-irmãos de longa data do BF pela torcida sempre positiva durante todas as minhas jornadas.

As amigas Ana, Raissa, Karla, Isabela, Gabriela e Bianca.

Ao meu amor, Thiago, pelo incentivo e palavras de carinho e conforto nos momentos de solidão em SP e por me aturar estressada e preocupada com os experimentos.

Aos peritos Bioquímicos Toxicologistas da Policia Civil do ES, pelo incentivo a conclusão do doutorado...tenho muito orgulho de agora fazer parte desta família.

Ao CNPq e FAPESP pelo financiamento desta pesquisa.

Por fim, a aqueles que sempre me apoiaram incondicionalmente, que apostaram em mim mais do que ninguém e que seguramente são os que mais compartilham da minha alegria: MINHA FAMÍLIA. Muito obrigada: Tia Claudia, Tia Eliane, Vovó Aurea, Vovô Dorico, vovó Izaura (*in memorian*), vovô Adaldo, Tio Reuber, Tio Fernando, Tia Soraia, Aline, Aliny, primos João Vitor, Arthur, Taina, Lunah, minha irmã Juliana, meus pais Roner e Jane...faço questão de escrever todos os nomes pois a presença de cada um de vocês sempre foi e sempre será minha maior fonte inspiração para novas conquistas.

## RESUMO

**COIMBRA, J.B. Ação de metabólitos da via das triptaminas em linhagens de melanoma.** 2015. 187f. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O triptofano (Trp) é essencial para muitos processos fisiológicos e seu metabolismo apresenta-se alterado em doenças como no câncer. O Trp é degradado por três vias: via das quinureninas; via serotoninérgica e via das triptaminas. A primeira está envolvida com a tolerância e o imune escape de células tumorais, já a segunda leva a produção de serotonina e melatonina, com uma diversidade de funções biológicas e que possuem atividades antitumorais reconhecidas. A terceira rota é a menos estudada e a função dos compostos sintetizados ainda é desconhecida. Trabalhos do grupo mostram que a via das triptaminas é ativa em melanomas e que triptamina (TRY) e dimetiltriptamina (DMT), metabólitos produzidos por esta via, também possuem atividade antitumoral. Nosso objetivo é avançar sobre a compreensão de como esta via afeta o metabolismo e crescimento tumoral. Para tanto, estudamos mais detalhadamente a via em linhagens de melanoma. A adição de TRY e DMT nas culturas modificou a produção de compostos das outras rotas de metabolização do Trp. Além disso, TRY e DMT afetaram a invasividade das células tumorais e TRY aumentou a atividade citotóxica de células mononucleares frente a melanomas. Observamos que apesar dos efeitos biológicos da via das quinureninas estar amplamente relacionado a ligação dos metabólitos no receptor de aril hidrocarbonetos, para a via das triptaminas o receptor parece não estar associado com a atividade antitumoral descrita. Nossos resultados apontam para a importância da via das triptaminas na dinâmica tumoral e a necessidade de estudos mais amplos relacionados ao metabolismo do Trp.

Palavras-chave: triptofano, metabolismo, melanoma, via das triptaminas.

## **ABSTRACT**

**COIMBRA, J.B. Action of tryptamines pathway metabolites in melanoma strains.**  
2015. 187f. (Doctoral Thesis). Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2015.

Tryptophan (Trp) is essential for many physiological processes and its metabolism is modified in several diseases such as in cancer. TRP is broken down into three pathways: kynurenine path, serotonergic path and tryptamine path. The first is involved in tolerance and immune escape of cancer cells, while the second leads to the production of serotonin and melatonin, which have a variety of biological functions and recognized antitumor activity. The third route is the least studied and the biological function of the synthesized compounds is still unknown. Our group shows that tryptamine path is active in melanomas and tryptamine (TRY) and dimethyltryptamine (DMT), metabolites produced by this route, also have antitumor activity. Our goal is make progress on understanding how tryptamine route affects metabolism and tumor growth. Therefore, we studied in detail this pathway in melanoma cell lines. The addition of TRY and DMT into the cultures leds the production of metabolites of other Trp routes. Moreover, TRY and DMT affect the invasiveness of tumor cells and TRY increased antitumor activity of the immune system against melanomas. We observed that despite biological effects of kynurenine path be largely related to metabolites binding aryl hydrocarbon receptor, for tryptamine pathway the receptor seems not to be associated with the described antitumor activity. Our results point the importance of tryptamine pathway in tumor dynamics and the need for broader studies related to Trp metabolism.

**Keywords:** tryptophan, metabolism, melanoma, tryptamines pathway.

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1: Parâmetros da otimização dos analitos de interesse: íon precursor (m/z), íon produto (m/z), fragmentor e energia de colisão (V). ..... 52

## **Lista de Figuras**

Figura 1: Metabolismo do Trp pela via das quinureninas (via KYN) (Imagen cedida pela aluna Ariane Rivellis). ..... 27

Figura 2: Metabolismo do Trp pela via serotoninérgica (via SER) (Imagen cedida pela aluna Ariane Rivellis). ..... 29

Figura 3: Metabolismo do Trp pela via das triptaminas. (Imagen cedida pela aluna Ariane Rivellis). ..... 30

Figura 4: Sinalização pelo receptor AHR. (a) o ligante se difunde para a célula e se liga ao complexo AHR citosólico. (b) O complexo ligante-receptor é translocado para o núcleo. (c) O AHR se dimeriza com ARNT e juntos se ligam ao DRE, (d) levando a ativação da transcrição. (e) O AHR é exportado para o citosol e é degradado. (f) O dimero AHRR -ARNT regula negativamente a atividade transcrecional do AHR. (Nuguyen, Bradfield, 2008)..... 36

Figura 5: Efeitos autócrinos e parácrinos de KYN no receptor AHR As células tumorais captam o triptofano (L-Trp) do meio extracelular e convertem L-Trp em quinurenina (Kyn), por meio da enzima triptofano-2,3-dioxigenase (TDO). A Kyn endógena ativa o AHR das células tumorias levando a proliferação e a motilidade celular. Ao mesmo tempo, a Kyn produzida também é secretada para o meio extracelular. A Kyn secretada é captada por células imunes vizinhas e se liga ao receptor AHR, onde induz a sua translocação para o núcleo e suprime a proliferação e a função das mesmas. (Optiz 2011). ..... 38

Figura 6: Espectro de massas do DMT após a purificação, análise em LC/MS do tipo *ion trap* por uma fonte de ionização por *electrospray*. ..... 48

Figura 7: Efeito da adição de TRY (100 µM) em melanomas SK-Mel-147 (A); SK-Mel-19 (B); B16 (C). As células foram tratadas e incubadas por 24 h. No painel (D), são descritas as alterações nas vias de degradação do Trp que foram comuns nas células estudadas. ND: não detectável; NQ: não quantificável. (\*) P <0,05; (\*\*) P <0,01; (\*\*\*) P <0,001..... 61

Figura 8: Efeito da adição de DMT (100 µM) em melanomas SK-Mel-147 (A); SK-Mel-19 (B); B16 (C). As células foram tratadas e incubadas por 24 h. No painel (D), são descritas as alterações nas vias de degradação do Trp que foram comuns nas células estudadas. ND: não detectável; NQ: não quantificável. (\*) P <0,05; (\*\*) P <0,01; (\*\*\*) P <0,001..... 67

Figura 9: Efeito da adição de KYN (100 $\mu$ M) em melanomas SK-Mel-147 (A); SK-Mel-19 (B); B16 (C). As células foram tratadas e incubadas por 24 h. No painel (D), são descritas as alterações nas vias de degradação do Trp que foram comuns nas células estudadas. ND: não detectável; NQ: não quantificável. (*) P < 0,05; (**) P < 0,01; (***) P < 0,001.....	72
Figura 10: Atividade antiproliferativa de DMT e TRY em melanomas. (a; b) Painel mostrando a atividade anticolonogênica de DMT e TRY em melanomas humanos SK-Mel-19 e SK-Mel-147 com concentrações de 100 $\mu$ M dos compostos. (c; d) Representação gráfica do número de colônias e área das mesmas quando as células são tratadas com concentrações crescentes de KYN, DMT e TRY. (*) P < 0,05; (**) P < 0,01; (***) P < 0,001. ....	74
Figura 11: Produção de triptamina pelos melanomas SK-Mel-147 e SK-Mel-19 após incubação por 24 h com 100 $\mu$ M de DMT. (*) P < 0,05; (**) P < 0,01; (***) P < 0,001.....	75
Figura 12: Análise da morte celular de melanomas realizada por citometria de fluxo. As células foram tratados com TRY, DMT ou KYN na concentração de 100 $\mu$ M por 48h e marcadas com anexina e iodeto de propídeo.....	77
Figura 13: Ciclo celular de melanomas. As células foram tratados com TRY (10 $\mu$ M); DMT (50 $\mu$ M) ou KYN (50 $\mu$ M) por 48 h e marcadas com iodeto de propídeo. A análise foi realizada por citometria de fluxo. (*) P < 0,05; (**) P < 0,01; (***) P < 0,001. ....	78
Figura 14: Ensaio de invasão celular de melanomas humanos SK-Mel-147 e SK-Mel-19 incubados com TRY (10 $\mu$ M); DMT ou KYN (50 $\mu$ M) por 48 h. (*) P < 0,05; (**) P < 0,01; (***) P < 0,001. ....	79
Figura 15: Atividade de MMP-2 (a) e TIMPs 1 e 2 (b;c) nas linhagens de melanomas humanos SK-Mel-147 e SK-Mel-19 incubados com TRY (10 $\mu$ M); DMT ou KYN (50 $\mu$ M) por 48 h. (*) P < 0,05; (**) P < 0,01; (***) P < 0,001. ....	81
Figura 16: Contagem do número de células de melanoma viáveis, após serem co-cultivadas com PBMC por 72 horas, com ou sem estímulo de TRY (10 $\mu$ M), DMT (50 $\mu$ M), IAA (20 $\mu$ M) ou KYN (50 $\mu$ M). (*) P < 0,05; (**) P < 0,01; (***) P < 0,001.....	87
Figura 17: Efeito da adição de TRY (10 $\mu$ M), DMT (50 $\mu$ M), IAA (20 $\mu$ M) ou KYN (50 $\mu$ M) em melanomas SK-Mel-147 e SK-Mel-19 isolados, em co-cultura e em PBMCs isolados. As células foram tratadas e incubadas por 48 h com os estímulos. (*) P < 0,05; (**) P < 0,01; (***) P < 0,001. ....	91
Figura 18: Efeito da adição de TRY (10 $\mu$ M), DMT (50 $\mu$ M), IAA (20 $\mu$ M) ou KYN (50 $\mu$ M) na produção de citocinas em melanomas SK-Mel-147 e SK-Mel-19 isolados e em co-cultura. As células foram tratadas e incubadas por 48 h com os estímulos. (*) P < 0,05; (**) P < 0,01; (***) P < 0,001 .....	94

Figura 19: Expressão gênica do AHR e CYP1A1 na ausência de estímulo e na presença de TRY e DMT (100 $\mu$ M) por PCR em tempo real. O gene <i>gapdh</i> foi utilizado como calibrador da reação. A análise comparativa foi feita em relação a expressão do gene <i>ido1</i> na linhagem SK-Mel-147. O método comparativo ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) foi utilizado para comparar os níveis de expressão de RNAm. (*) $P < 0.05$ ; (**) $P < 0.01$ ; (***) $P < 0.001$ .....	104
Figura 20: Atividade do CYP1A1 em melanomas tratados e não tratados com TRY, DMT, KYN (100 $\mu$ M) e TCDD (10 nM) por um período de 12 ou 24 h. O cálculo da atividade foi feito com base na produção de resorufina. (*) $P < 0.05$ ; (**) $P < 0.01$ ; (***) $P < 0.001$ .....	106
Figura 21: Imunofluorescência do receptor AHR. As células SK-Mel-19 foram tratadas com TCDD (10 nM) por 2 h e fixadas formaldeído 4%. O bloqueio foi realizado por 2 h. Para a marcação do receptor AHR (verde), foi utilizado o anticorpo monoclonal do receptor de aril hidrocarbonetos (Abcam 2769) na proporção 1:200. O citoplasma (vermelho) foi marcado com rodamina-faloidina (1:20) e o núcleo (azul) com DAPI. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência, no aumento de 10x.....	107
Figura 22: (a; c) Painel mostrando a atividade clonogênica da linhagens SK-Mel-147; SK-Mel-19; T98G e Hepa1c1c7; ( b; d) Representação gráfica do número de colônias e área das mesmas quando as células são tratadas com CH223191 (1 $\mu$ M); TCDD (10 nM); TRY (100 $\mu$ M); DMT (100 $\mu$ M); KYN (100 $\mu$ M); TCDD (10 nM) + CH223191 (1 $\mu$ M); TRY (100 $\mu$ M) + CH223191 (1 $\mu$ M); DMT (100 $\mu$ M) + CH223191 (1 $\mu$ M); KYN (100 $\mu$ M) + CH223191 (1 $\mu$ M) . (*) $P < 0.001$ , comparação com as células controle e (#) $P < 0.001$ , comparação tratamento x tratamentos + inibidor. ....	111
Figura 23: Efeito da adição de TRY; DMT ou KYN (100 $\mu$ M) em na via das triptaminas e formação de PANs em células SK-Mel-147 (A); SK-Mel-19 (B) e B16 (C). O período de incubação com os tratamentos foi de 24 h. (*) $P < 0,05$ ; (**) $P < 0,01$ ; (***) $P < 0,001$ .....	118
Figura 24: Via das triptaminas e formação de PANs em melanomas (SK-Mel-147; SK-Mel-19 e B16) e células mononucleares (monócito e linfócitos). ....	121
Figura 25: Efeito da adição de IFN- $\gamma$ (50 ng/mL) ou 1-MT (1mM) na via das triptaminas e formação de PANs em células SK-Mel-147 (A) e SK-Mel-19 (B). O período de incubação com os tratamentos foi de 24 h. (*) $P < 0,05$ ; (**) $P < 0,01$ ; (***) $P < 0,001$ .....	123
Figura 26: Efeito da adição de IFN- $\gamma$ (50 ng/mL) ou 1-MT (1mM) na via das triptaminas e formação de PANs em monócitos (A) e linfócitos (B) obtidos de sangue periférico. O período de incubação com os tratamentos foi de 24 h. No painel (D), está em destaque a modificação sofrida por ambos os tipos celulares. (*) $P < 0,05$ ; (**) $P < 0,01$ ; (***) $P < 0,001$ .....	126

## **Lista de Abreviaturas**

1-MT - 1-metiltriptofano

5-HTP - 5 - hidroxi-triptofano

5-MOTA - 5-metóxitriptamina

AA - ácido antranílico

AADC - aminoácido aromático descarboxilase

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

AHR - receptor de aril hidrocarbonetos

AMK - *NI*-acetil- $\alpha$ 5-metóxiquinuramina

ARNT- receptor de aril hidrocarbonetos nuclear

BSA – albumina sérica bovina

CCL - comprometimento cognitivo leve

DA - Doença de Alzheimer

DMEM - *Dulbecco's modified Eagle's media*

DMFK -*N,N*-dimetilformilquinuramina

DMK - *N,N*-dimetilquinuramina

DMSO - dimetilsulfóxido

DMT - dimetiltriptamina

DMT-NO dimetiltriptamina-*N*-óxido

DRE- elementos sensíveis de dioxinas

EtOAc - acetato de etila

HIAA – ácido 5-hidróxi-indol-acético

HK - 3-hidróxi-quinurenina CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

IAA - ácido 3-indolacético

IDO - indolamina 2,3 dioxigenase

IFN - interferon

INMT- triptamina-*N*-metil-transferase

KA - ácido quinurênico

KD – constante de dissociação

KYM - quinuramina

KYN - quinurenina

LC/MS - cromatografia liquida acoplada a espectrômetro de massas

MAO - monoamino oxidases

MEL- D7 -melatonina-D7

MeOH - metanol

MLT- melatonina

MPO - mieloperoxidase

MRM – reação de monitoramento múltiplo

NA - ácido nicotínico

NFK - *N*-formilquinurenina

NMDA - receptor N-metil-D-aspartato

NMT - *N*-metiltriptamina

PANs - produtos de abertura do anel indólico

PBMC – células mononucleares do sangue periférico

QA - ácido quinolínico

SAM - S-adenosil-metionina

SER - 5-hidróxi-triptamina/ serotonina

SFB - soro fetal bovino

TCDD - 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina

TDO - triptofano 2,3 dioxigenase

TME - triptofano metil éster

TPH - triptofano hidroxilase

Trp - triptofano

TRY - triptamina

Via KYN - via das quinureninas

Via SER - via serotonérgica

Via TRY- via das triptaminas

XA - ácido xanturênico

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>22</b>
<b>2.REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>25</b>
2.1. Vias metabólicas do triptofano .....	26
2.2. Biossíntese de TRY e DMT.....	31
2.3. Metabolização de TRY e DMT .....	32
2.4. O papel das vias metabólicas do Trp em tumores.....	33
2.5. Metabólitos do triptofano e o receptor de aril hidrocarbonetos (AHR) .....	35
2.6. Melanomas humanos.....	39
<b>3.OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
3.1. Objetivos específicos .....	43
<b>4.CAPÍTULO I.....</b>	<b>45</b>
<b>EFEITOS DA VIA DAS TRITPTAMINAS EM LINHAGENS DE MELANOMAS .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1. Materiais e Métodos .....</b>	<b>46</b>
4.1.1.Cultivo celular.....	46
4.1.2. Síntese e purificação da DMT .....	47
4.1.3. Ensaios celulares e DMT .....	49
4.1.4. Extração e detecção dos metabólitos do Trp em culturas celulares .....	49
4.1.4.1. Desenho experimental .....	49
4.1.4.2. Extração dos metabólitos .....	49
4.1.4.3. Instrumentação analítica para o estudo do metabolismo do Trp.....	50
4.1.5. Ensaio clonogênico .....	53
4.1.6. Ensaio de viabilidade celular por citometria de fluxo .....	54

4.1.7. Análise de ciclo celular .....	54
4.1.8. Ensaio de Invasão .....	55
4.1.9. Determinação da atividade das metaloproteinases de matriz 2 e da concentração dos inibidores teciduais de MMPs 1 e 2.....	55
4.1.10. Análise estatística.....	56
<b>4.2. Resultados e Discussão .....</b>	<b>56</b>
4.2.1. Via das triptaminas e demais rotas de degradação do Trp.....	56
4.2.1.1.Efeito da adição de TRY no metabolismo do triptofano em melanomas.....	57
4.2.1.2. Efeito da adição de DMT no metabolismo do triptofano em melanomas .....	62
4.2.1.3. Efeito da adição de KYN no metabolismo do triptofano em melanomas .....	68
4.2.2. Atividades biológicas de TRY e DMT em melanomas.....	73
4.2.2.1. Ensaio Clonogênico .....	73
4.2.2.2. Morte celular.....	76
4.2.2.3. Ciclo celular.....	77
4.2.2.4. Ensaio de invasão celular .....	79
4.2.2.5. Determinação da atividade das metaloproteinases de matriz 2 e da concentração dos inibidores teciduais de MMPs 1 e 2.....	80
<b>5. CAPÍTULO II.....</b>	<b>82</b>
<b>EFEITOS IMUNOMEDIADOS DA VIA DAS TRITPTAMINAS EM MELANOMAS .....</b>	<b>82</b>
<b>5.1. Materiais e Métodos .....</b>	<b>83</b>
5.1.1. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) .....	83
5.1.2. Ensaios de co-cultura.....	84
5.1.3. Extração de metabólitos do Trp das co-culturas .....	85
5.1.4. Determinação de citocinas pelo método de ELISA .....	85

<b>5.2. Resultados e Discussão .....</b>	<b>86</b>
<i>5.2.1. Análise da citotoxicidade de TRY, DMT, IAA e KYN em co-culturas de melanomas</i>	86
<i>5.2.2. Metabólitos do Trp em co-culturas de melanoma.....</i>	87
<i>5.2.3. Produção de citocinas .....</i>	93
<b>6. CAPÍTULO III.....</b>	<b>97</b>
<b>ESTUDO DO RECEPTOR DE ARIL HIDROCARBONETOS .....</b>	<b>97</b>
<b>6.1. Materiais e Métodos .....</b>	<b>98</b>
<i>6.1.1. Cultivo celular.....</i>	98
<i>6.1.2. Expressão de AHR e CYP1A1 .....</i>	99
<i>6.1.3. Atividade do CP1A1 .....</i>	100
<i>6.1.4. Imunofluorescência .....</i>	100
<i>6.1.5. Ensaio clonogênico .....</i>	101
<b>6.2. Resultados e Discussão .....</b>	<b>102</b>
<i>6.2.1. Estudo do receptor AHR .....</i>	102
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>113</b>
<b>8. MATERIAL SUPLEMENTAR.....</b>	<b>116</b>
<i>8.1. Efeito de TRY, DMT e KYN na formação de PAN em melanomas.....</i>	117
<i>8.2. Vias das triptaminas e formação de produtos de abertura do anel indólico em células tumorais e normais.....</i>	120
<i>8.3. Efeito de IFN-<math>\gamma</math>, 1-MT e 1-MT + IFN-<math>\gamma</math> na via das triptaminas e na formação de PANs .....</i>	122
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>128</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>139</b>
<i>10.1. Curriculo Lattes e Ficha do aluno .....</i>	140

<i>10.3. Orientações para banca examinadora .....</i>	153
<i>10.4. Publicações .....</i>	154

## *1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA*

---

A via das triptaminas é a rota de degradação do aminoácido essencial triptofano (Trp) menos estudada. Nesta via metabólica são formados os metabólitos triptamina (TRY) e dimetiltriptamina (DMT). Este último é uma molécula amplamente conhecida por sua presença na planta *Psychotria viridis*, que é utilizada na preparação de um chá alucinógeno – *ayahuasca* - consumido em algumas cerimônias religiosas.

Tanto TRY quanto DMT são sintetizadas em baixíssimas concentrações no corpo humano, sendo denominadas aminas traço. Além disso, o DMT sintetizado é armazenado em vesículas, o que sugere que o composto tenha um papel vital em mamíferos<sup>1;2</sup>. A real importância da presença dessas moléculas no organismo humano ainda não foi elucidada, já que poucos estudos com aminas traço foram realizados.

Durante o meu mestrado, mostramos que linhagens de melanoma humano possuem a via das triptaminas ativa e são capazes de não apenas sintetizar TRY e DMT, mas também de metabolizar estes compostos levando a formação de produtos de abertura do anel indólico (PANs). Além disso, estudos do grupo demonstram ainda que células do sistema imune possuem a via das triptaminas ativa<sup>3</sup>.

Já em relação as atividades biológicas, nosso grupo de trabalho comprovou que os compostos TRY e DMT inibem atividade da enzima indolamina 2,3 dioxigenase (IDO) em um sistema livre de células e na presença de células tumorais de glioma humano A172. A IDO é responsável pela conversão de Trp em quinurenina (KYN), metabólito altamente correlacionado com um mau prognóstico em pacientes com câncer

<sup>4</sup>. Ambos os compostos aumentam ainda o efeito citotóxico de linfócitos contra as células de glioma, revelando um efeito antitumoral indireto dos metabólitos mediado pelo sistema imune <sup>5</sup>. Durante o meu mestrado, comprovamos também que os compostos podem atuar diretamente em linhagens de melanoma humano diminuindo a proliferação das células tumorais <sup>6</sup>. Todos esses dados reforçam a importância da via das triptaminas.

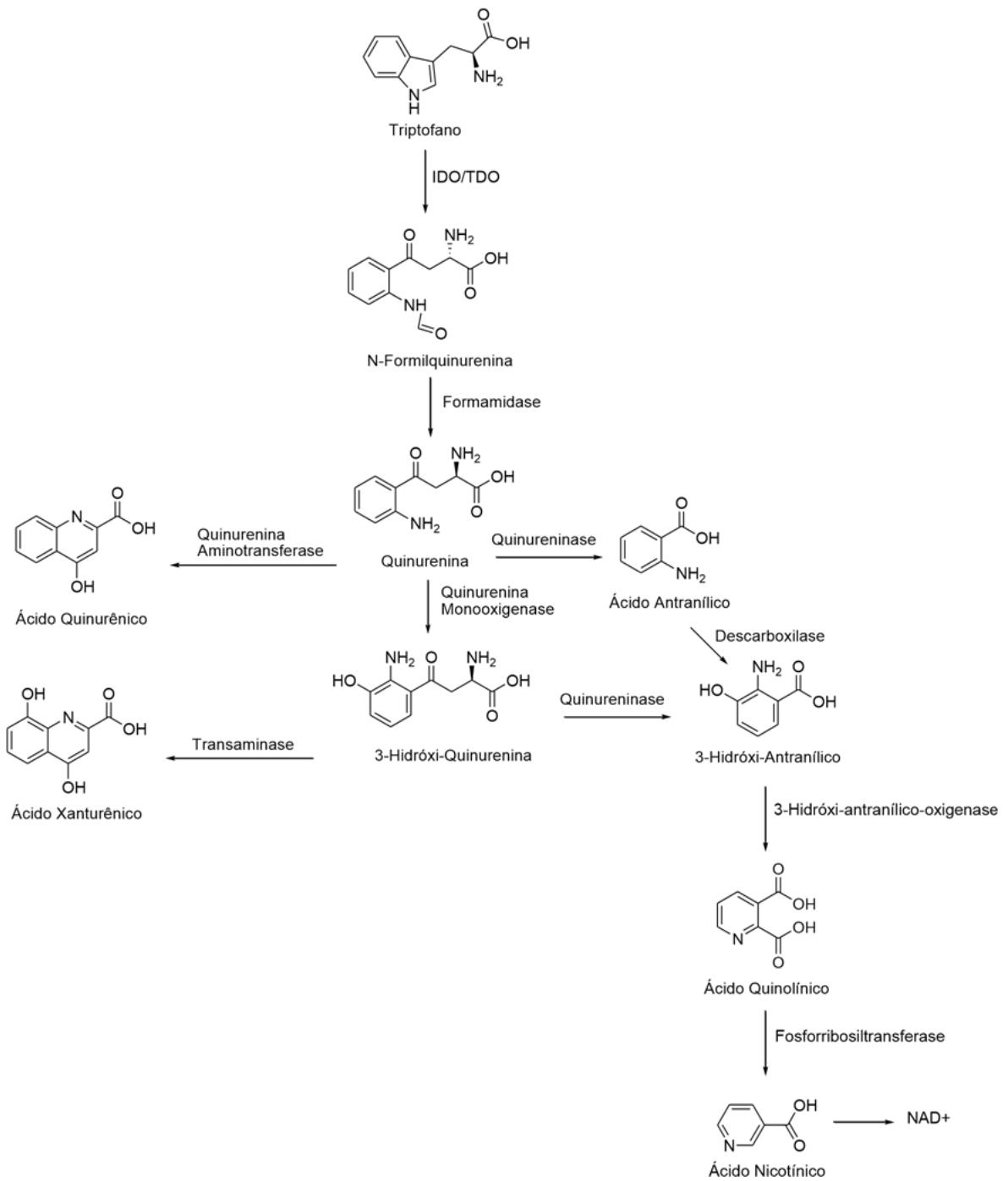
No presente trabalho procuramos avançar nos estudos de metabolismo e atividade antitumoral da via das triptaminas em linhagens de melanoma e sobre a relação destas com o sistema imunológico.

## *2.REVISÃO DE LITERATURA*

---

## **2.1. Vias metabólicas do triptofano**

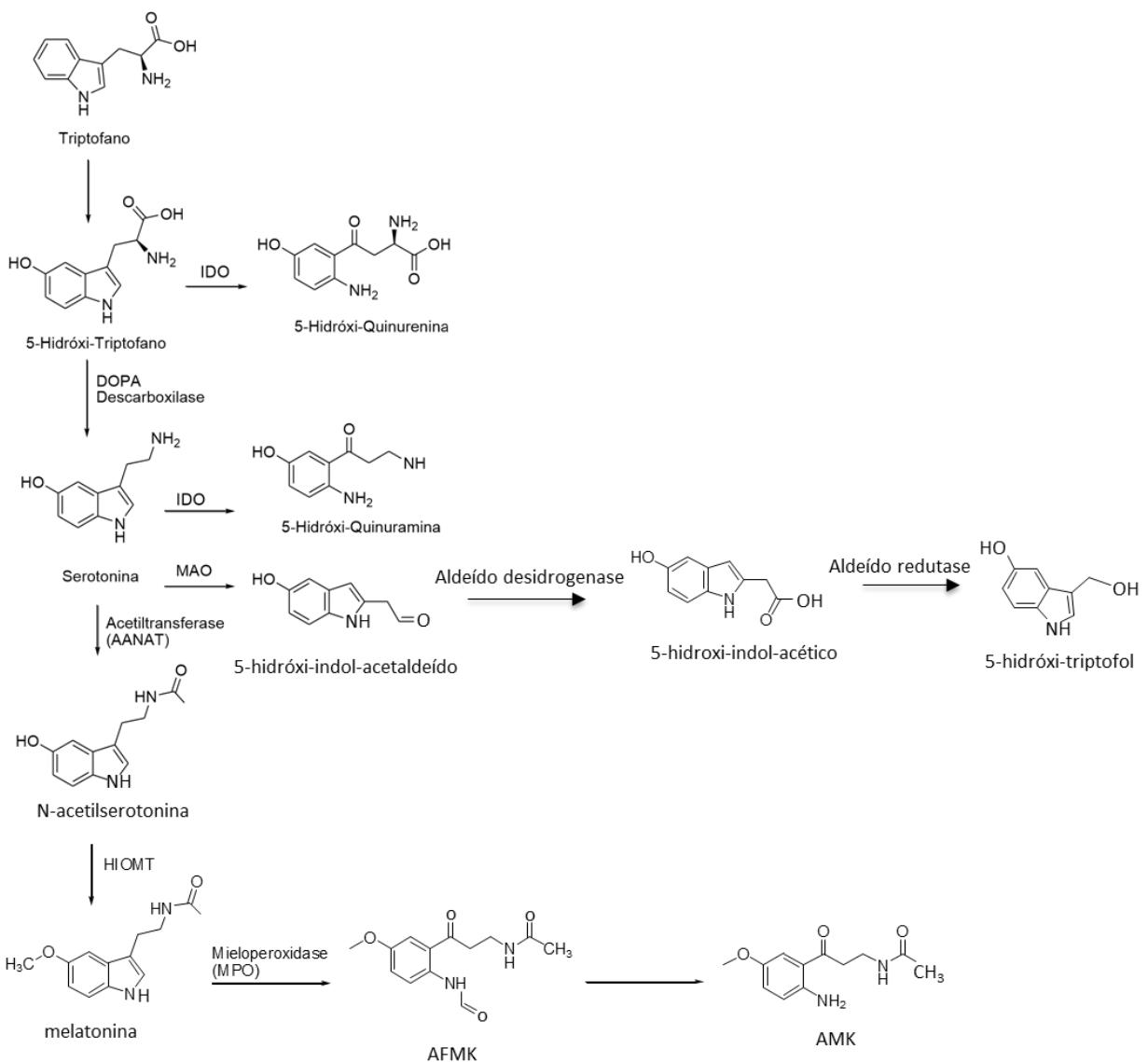
O triptofano (Trp) gera compostos biologicamente ativos através de três principais vias, a via das quinureninas (Via KYN), via serotonérgica (Via SER) e a via das triptaminas (Via TRY). A via KYN é responsável pela degradação de cerca de 95% do Trp que não é utilizado para a síntese proteica, nesta via, a formação de *N*-formilquinurenina (NFK) constitui a etapa limitante do processo através das enzimas triptofano 2,3 dioxigenase (TDO), presente no fígado e indolamina 2,3 dioxigenase (IDO), presente em diversos tecidos incluindo células do sistema imune <sup>7;8</sup>. A NFK é rapidamente deformilada a quinurenina (KYN), que pode ser substrato de diferentes enzimas. Quando sofre ação da quinureninase, a KYN gera ácido antranílico (AA). Já a enzima quinurenina monoxidase, atua na KYN produzindo o metabólito 3-hidroxi-quinurenina (HK), que assim como o AA, pode ser convertido a ácido 3-hidróxi-antranílico (HAA). A enzima ácido 3-hidróxi-antranílico oxigenase catalisa a conversão do HAA em ácido quinolínico (QA). O QA produzido é catalisado por uma fosforibosil-transferase a ácido nicotínico (NA), posteriormente degradado a NAD<sup>+</sup> <sup>9</sup>. Por ação de uma transaminase, a HK gera ácido xanturênico (XA) <sup>10</sup>. Já a enzima quinurenina aminotransferase converte a KYN em ácido quinurênico (KA) e uma descarboxilase gera quinuramina (KYM), em uma reação que ocorre principalmente no fígado <sup>9</sup> (Figura 1).



**Figura 1:** Metabolismo do Trp pela via das quinureninas (via KYN) (Imagen cedida pela aluna Ariane Rivellis).

Na via SER, o Trp é hidroxilado na quinta posição do anel indólico a 5- hidroxí-triptofano (5-HTP) que é posteriormente descarboxilado à 5-hidróxi-triptamina (SER), pela enzima L-aminoácidos aromáticos descarboxilase (DOPA-descarboxilase)<sup>12</sup>. Tanto 5- HTP como a SER podem sofrer ação da IDO e serem convertidos a 5-hidróxi-quinurenina e 5-hidróxi-quinuramina, respectivamente, o que demonstra que as vias KYN e SER se intercomunicam. A SER pode ser catalisada pelas enzimas monoamino oxidases (MAO) em humanos, principalmente pela MAOa mitocondrial<sup>12</sup>, e formar ácido 5-hidróxi-indol-acético (HIAA).

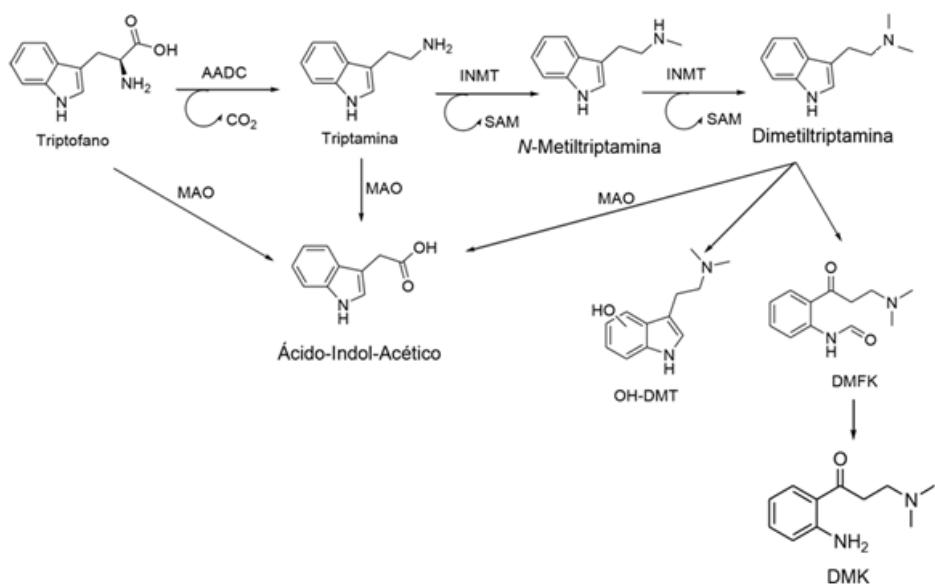
Alguns tecidos são capazes de utilizar SER para a síntese de melatonina (MLT). A SER sofre *N*-acetilação (serotonina *N*-acetil-transferase) seguida de uma metilação (hidróxi-indol-O-metil-transferase), e forma *N*-acetil-5-metóxi-triptamina, a MLT<sup>13; 14</sup>, sendo então precursora dessa via. A melatonina tem capacidade de capturar radicais de oxigênio e gerar diferentes metabólitos<sup>15</sup>. O metabólito N1-acetil-N2-formil-5-metóxiquinuramina (AFMK) é considerado o principal metabólito da melatonina, sendo obtido por reações com radicais hidroxila e oxigênio singlete, mas também pode ser produzido por catálise enzimática por mieloperoxidase de neutrófilos<sup>16</sup> e pela IDO em diferentes tecidos<sup>17; 18</sup>. O AFMK obtido por oxidação da MLT pode ser deformilado por uma catalase (hemoperoxidase) e dar origem a *N*1-acetil- $\alpha$ 5-metoxiquinuramina (AMK)<sup>19</sup>. Juntos, AFMK e AMK são os metabólitos da melatonina mais encontrados no sistema nervoso central (Figura 2).



**Figura 2:** Metabolismo do Trp pela via serotoninérgica (via SER) (Imagen cedida pela aluna Ariane Rivellis).

Apesar das vias KYN e SER somadas serem responsáveis pela quase totalidade do metabolismo de Trp, uma pequena parte do aminoácido segue a via das triptaminas.

Nesta via, inicialmente o Trp é descarboxilado pela enzima aminoácido aromático descarboxilase (AADC) e dá origem a triptamina (TRY), está é dimetilada pela S-adenosil-metionina (SAM) por ataque nucleofílico em uma reação catalisada pela enzima indoletilamina-*N*-metil-transferase (INMT), levando a formação de *N*-metiltriptamina e dimetiltriptamina (DMT)<sup>20</sup>. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a DMT é hidroxilada por mieloperoxidase (MPO) proveniente de neutrófilos ativados, gerando bufotenina ou psilocina (ambas hidroxiladas no anel benzênico da DMT, em diferentes posições, DMT-OH). Peroxidases também foram responsáveis pela formação de um produto de abertura do anel indólico nomeado como *N,N*-dimetil-*N*-formilquinuramina (DMFK), sua forma deformilada, também encontrada no meio de reação, foi denominada *N,N*-dimetil-quinuramina (DMK)<sup>21</sup> (Figura 3).



**Figura 3:** Metabolismo do Trp pela via das triptaminas. (Imagen cedida pela aluna Ariane Rivellis).

## **2.2. Biossíntese de TRY e DMT**

Após a descoberta de que a enzima INMT está presente em pulmões de coelhos, estudos foram realizados na tentativa de detectar a presença TRY e DMT em humanos e outros mamíferos <sup>22</sup>. Em 1965, TRY, DMT e 5-hidroxi-*N*, *N*-dimetiltriptamina (bufotenina [DMT-OH]) foram detectados em amostras de urina (TRY = 30 – 120 µg/24 horas; DMT = 42,98 ± 8,6 µg/24 horas), sangue (TRY = 0,005 – 0,02 µg/mL; DMT = 0,008-0,055 µg/mL) e fluido cerebrospinal de indivíduos saudáveis, sendo reportados como constituintes endógenos normais de seres humanos <sup>23</sup>. Porém, estudos subsequentes encontraram concentrações menos elevadas, cerca de 0,4 µg/24 horas de DMT na urina e 0,5 ng/mL no sangue <sup>24; 25</sup>. Ainda hoje não há estudos quantitativos conclusivos a respeito da concentração exata de TRY e DMT devido ao seu rápido metabolismo. Porém, sabe-se que estes compostos também estão presentes em fezes, rim e pulmão de humanos <sup>26; 27</sup>.

Além de produzida por células humanas, a DMT também é sintetizada pela planta *Psycotria viridis*, utilizada na preparação de um chá com propriedades alucinógenas denominado *ayahuasca*, possuindo relevância toxicológica significativa <sup>20; 28</sup>. Recentemente, publicamos um trabalho que demonstra a síntese de TRY e DMT em uma linhagem de melanoma humano <sup>21</sup>. A importância da biossíntese destes compostos em melanomas ainda é uma questão a ser respondida.

### **2.3. Metabolização de TRY e DMT**

Como apresentado, TRY pode ser dimetilada e formar DMT, mas pouco se sabe sobre a metabolização da DMT. De uma dose administrada por via intramuscular, apenas 0,07% são excretados na urina na forma inalterada e 25% são metabolizados a ácido 3-indolacético (IAA). Esse perfil de biotransformação sugere a existência de outros possíveis metabólitos ainda não identificados<sup>29; 30</sup>.

Em 1956, foi proposto que as principais reações de metabolização da DMT *in vivo* são 6-hidroxilação, *N*-demetilação e a oxidação pela enzima MAO-A<sup>31</sup>. Posteriormente, em 1986, um estudo em diversos tecidos de rato demonstrou que em tecido cerebral, a DMT é metabolizada a DMT-N-óxido (DMT-NO) e indolacetaldeído que é rapidamente convertido a ácido indol acético (IAA). Em tecido renal, os autores demonstraram a presença de DMT-NO e uma quantidade pequena de *N*-metiltriptamina (NMT). Já no fígado, foram encontrados, DMT-NO, NMT e IAA<sup>32</sup>. Assim, percebemos que tecidos diferentes apresentam perfis distintos de metabolização da DMT de modo a favorecer o aparecimento de um ou outro metabólito.

Apesar de uma rota metabólica para a DMT ter sido sugerida, a rota concreta e o papel das enzimas da via e metabólitos formados continuam não elucidadas. Recentemente, demonstramos que a DMT pode ser metabolizada levando a formação de produtos de abertura do anel indólico DMFK e DMK<sup>21</sup>. Resultados obtidos em meu mestrado demonstraram ainda que linhagens de melanoma humano são capazes de

metabolizar DMT a DFMK<sup>6;21</sup>. Assim como a biossíntese, a importância da metabolização de DMT por linhagens de tumor permanece uma questão a ser estudada.

#### ***2.4. O papel das vias metabólicas do Trp em tumores***

Dentre a vasta gama de funções, as vias metabólicas do triptofano participam de vários processos fisiológicos e patológicos como inflamação, no controle da ativação de células T (regulação da sua ativação, proliferação e apoptose <sup>33</sup>), no comportamento, humor e sono <sup>34</sup>, controle das funções do trato gastrointestinal <sup>35</sup> e de doenças autoimunes <sup>9</sup>, neurodegenerativas <sup>36;37</sup> e câncer.

Hoje se reconhece que o impacto da depleção de Trp e ação de quinureninas sobre células do sistema imune fazem parte dos principais mecanismos dos processos de tolerância, imune escape e progressão tumoral <sup>38</sup>. Este reconhecimento também tem impacto no diagnóstico laboratorial e na terapêutica. Por exemplo, o aumento da razão entre KYN/Trp plasmáticos e a alta expressão de IDO em células tumorais se relacionam a um mau prognóstico em pacientes com câncer<sup>4</sup>. Na terapêutica, a inibição da IDO tem sido considerada uma estratégia excelente para a restauração da imunidade do hospedeiro. Estudos relatam que o tratamento quimioterápico convencional, juntamente com um inibidor da IDO, tem resultados promissores no tratamento de tumores <sup>39</sup>.

É sugerido que a MLT possa controlar o crescimento tumoral por sua ação anti-angiogênica natural<sup>40</sup> ou então através de seus efeitos imunomodulatórios, anti-proliferativos e antioxidantes<sup>41</sup>. Há ainda um estudo que mostra que a MLT atua como indutor de apoptose em células tumorais<sup>42</sup>. Trabalhos do grupo demonstraram que AFMK e AMK mantêm as atividades biológicas reconhecidas para a MLT<sup>43;44;45</sup> sugerindo que a metabolização da MLT à AFMK em sítios inflamatórios teria um papel na imunomodulação.

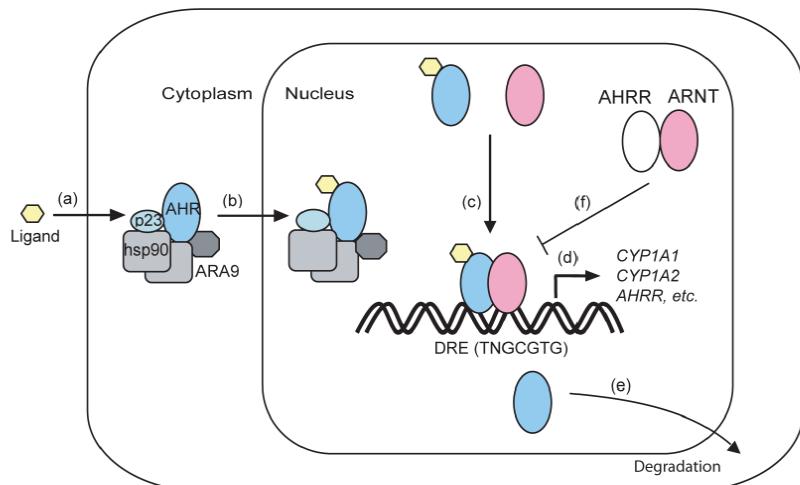
Apesar das funções ansiolíticas descritas para o DMT no sistema nervoso<sup>46;47</sup> não existem estudos conclusivos sobre a via das triptaminas em tumores, o que se sabe é que uma baixa expressão da enzima INMT, responsável pela síntese de DMT têm sido relatada em alguns tipos de câncer<sup>48;49</sup>. Estudos recentes mostram que a *ayahuasca*, bebida que contém DMT, aumenta a concentração de células NK na circulação sanguínea de humanos<sup>50</sup>, e Frecka et al (2013) observaram ainda um aumento significativo na secreção de interferon beta e gama em cultura de células NK humanas, após a administração de DMT. Considerando que o interferon pode ser utilizado como um fármaco antitumoral, a DMT poderia regular a resposta imune contra tumores<sup>2;50</sup>. Corroborando com estes dados, nosso grupo de pesquisa identificou que tanto TRY quanto DMT aumentam o efeito citotóxico de linfócitos sobre a célula tumorais de glioma humano<sup>5</sup>. E resultados do meu mestrado mostram que ambos os compostos são capazes de afetar a clonogenicidade de células de melanoma humano, apresentando uma

atividade antitumoral significativa<sup>6</sup>. Todos estes indícios nos levam a crer que a via das triptaminas têm um papel relevante na regulação da progressão do câncer atuando tanto via sistema imune quanto diretamente sobre tumores.

## ***2.5. Metabólitos do triptofano e o receptor de aril hidrocarbonetos (AHR)***

Em 1998 foi descoberto que alguns metabólitos do Trp poderiam induzir a translocação do receptor de aril hidrocarbonetos (AHR) para o núcleo<sup>51</sup>. O AHR é um receptor encontrado na maioria das células humanas, e pode atuar modulando a proliferação celular, a transformação neoplásica e a apoptose por alterar a expressão e/ou função de componentes de sinalização intracelular<sup>52; 53</sup>. Este receptor é classicamente ativado por xenobióticos como benzo[a]pireno e 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD). Na ausência de agonista, a AHR existe como um complexo inativo com duas moléculas Hsp90, bem como moléculas ARA9 (também conhecido como AIP1 ou XAP2) e p23<sup>54</sup>. Em modelos atuais de sinalização, a ligação de um agonista no domínio PAS da AHR conduz a uma alteração conformacional no receptor, como resultado o complexo do receptor migra para o núcleo, onde o AHR se heterodimeriza com o translocador AHR nuclear (ARNT), que interage com o núcleo de ligação dos elementos sensíveis de dioxinas (DRE), localizado em regiões regulatórias de genes alvo de AHR. Uma montagem de coativadores e fatores de transcrição interagem com genes promotores e potencializam a expressão do loco alvo. Os mais

bem estudados destes genes responsivos incluem os locos gênicos CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1 (Figura 4) <sup>54; 55</sup>.

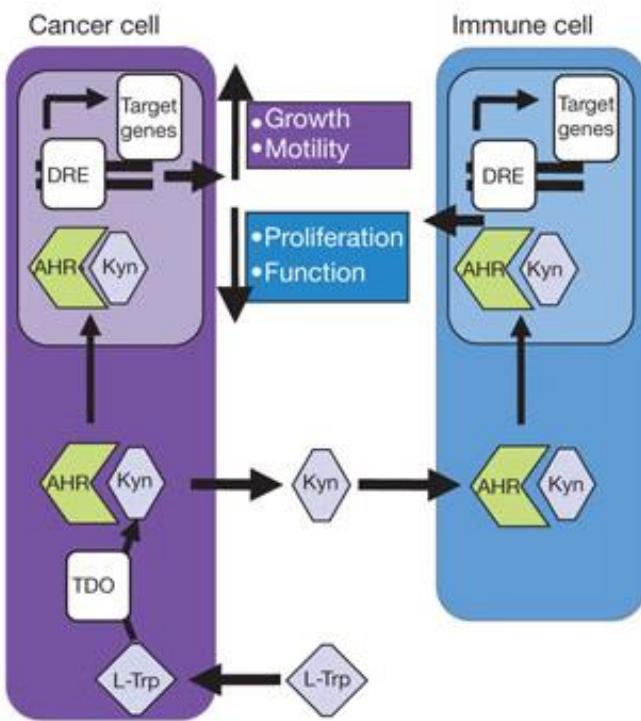


**Figura 4:** Sinalização pelo receptor AHR. (a) o ligante se difunde para a célula e se liga ao complexo AHR citosólico. (b) O complexo ligante-receptor é translocado para o núcleo. (c) O AHR se dimeriza com ARNT e juntos se ligam ao DRE, (d) levando a ativação da transcrição. (e) O AHR é exportado para o citosol e é degradado. (f) O dímero AHRR -ARNT regula negativamente a atividade transcracional do AHR. (Nuguyen, Bradfield, 2008).

A busca por ligantes endógenos do receptor AHR levou a identificação de que Trp, TRY e IAA induzem a translocação e a ligação do AHR no DNA, enquanto 5-OH-Trp; 5-OH-TRY; MLT e 5-metoxitriptamina (5-MOTA) não são capazes de produzir o mesmo efeito. A TRY foi mais potente em induzir a translocação do que o IAA ( $EC_{50} \sim 0,2$  e  $\sim 0,5$  mM, respectivamente) e ambos foram muito menos potentes que o principal ligante exógeno TCDD ( $EC_{50} \sim 0,1$  nM) <sup>51</sup>. Dada a fraca potência como ligante do AHR é improvável que IAA e TRY possam afetar a sinalização em condições fisiológicas, visto que a concentração de IAA no plasma é de cerca de 2-3 nM. Porém,

em certos estados patológicos, os metabólitos de triptofano podem tornar-se relevantes para a sinalização via AHR, principalmente na presença de inibidores da monoamina oxigenase, onde as concentrações de TRY podem ser maiores que 700 µM, sugerindo que em certas condições pode haver ativação do AHR por derivados do triptofano<sup>51; 54</sup>.

Em 2011, análises de *microarray* de gliomas tratados com KYN demonstraram que este composto foi capaz de induzir resposta no gene AHR e que o mecanismo de imune escape tumoral é dependente da ativação deste receptor (Figura 5). Além disso, foi verificado que gliomas expressam constitutivamente o AHR e são capazes de produzir KYN em quantidade suficiente para ativá-lo<sup>55</sup>. Outros metabólitos da via KYN também são ligantes deste receptor, o AA e HAA estão envolvidos com a etiologia do câncer de bexiga e ambos podem auto-oxidar e gerar radicais intermediários mutagênicos que se ligam ao AHR<sup>56</sup>. Já o KA é um potente ligante endógeno do receptor que pode induzir a produção de IL-6 e o metabolismo de xenobióticos em concentrações fisiológicas<sup>57</sup>.



**Figura 5:** Efeitos autócrinos e parácrinos de KYN no receptor AHR As células tumorais captam o triptofano (L-Trp) do meio extracelular e convertem L-Trp em quinurenina (Kyn), por meio da enzima triptofano-2,3-dioxigenase (TDO). A Kyn endógena ativa o AHR das células tumorais levando a proliferação e a motilidade celular. Ao mesmo tempo, a Kyn produzida também é secretada para o meio extracelular. A Kyn secretada é captada por células imunes vizinhas e se liga ao receptor AHR, onde induz a sua translocação para o núcleo e suprime a proliferação e a função das mesmas. (Optiz 2011).

Apesar de possuir um efeito pró tumoral importante quando ativado por metabólitos da via KYN, vários estudos demonstram que o AHR atua como supressor de tumor em modelo animal de câncer de próstata<sup>58; 59</sup> e moduladores seletivos do receptor inibem a proliferação de células de câncer de mama<sup>60; 61</sup>. Dependendo do tipo celular e do ligante, o AHR pode possuir uma ação pró tumoral ou antitumoral, uma das hipóteses do nosso grupo de trabalho é que a ativação do receptor AHR por metabólitos

da via das triptaminas poderia estar associado a atividade antitumoral dos compostos nas linhagens de melanomas estudadas.

## **2.6. Melanomas humanos**

O melanoma é um tipo de câncer que se desenvolve nos melanócitos (células responsáveis pela pigmentação da pele) e ocorre em partes como pele, olhos, orelhas, trato gastrointestinal, membranas mucosas e genitais. Embora o câncer de pele seja o mais frequente no Brasil e corresponda a 25% de todos os tumores malignos registrados no país, o melanoma representa apenas 4% das neoplasias malignas do órgão, porém é responsável por 65% das mortes por câncer de pele<sup>62</sup>. A sua incidência continua a aumentar em todo o mundo, sendo um dos tipos mais comuns de câncer em jovens adultos. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), somente no Brasil são estimados 188.020 novos casos para o ano de 2015<sup>63</sup>.

Na pele, o melanoma inicia-se habitualmente na epiderme a partir de mutação ocorrida em um melanócito aí localizado. É denominado carcinoma *in situ* enquanto se encontra confinado à epiderme, incluindo-se nesta o epitélio anexial (folículos pilosos e glândulas sudoríparas), nesta fase não existe risco de metastização, em virtude de o epitélio carecer de vasos sanguíneos e linfáticos. O passo seguinte na evolução do melanoma corresponde à invasão da derme e a partir deste momento se torna realmente “maligno”, uma vez que ganha a possibilidade de metastizar para tecidos e órgãos distantes<sup>64</sup>.

Os melanomas são tumores altamente imunogênicos, compostos por células neoplásicas, não-neoplásicas e imunológicas em várias proporções e são capazes de modular o microambiente tumoral induzindo imunossupressão por diversos mecanismos, como regulação negativa de抗ígenos de superfície, indução de mutações no interior das células malignas e secreção de citocinas imunossuppressoras<sup>65</sup>. Citocinas que normalmente ativam a resposta imune antitumoral como IL-2, TNF-α e IFN-γ também podem contribuir para a evasão do sistema imune. Foi descrito que o TNF-α diminui a capacidade de reconhecimento das células tumorais pelas células T<sup>66</sup> e a secreção de IFN-γ é capaz de induzir a expressão da enzima indolamina 2,3 dioxigenase (IDO), que suprime a resposta imune de linfócitos T e está envolvida com a progressão de várias neoplasias malignas<sup>67</sup>.

Todos os fatores mencionados dificultam o tratamento do tumor, porém, nos últimos anos, principalmente devido à detecção precoce, houve uma grande melhora na sobrevida dos pacientes com melanoma. A sobrevida média mundial estimada em 5 anos é de 69%, sendo de 73% nos países desenvolvidos e de 56% nos países em desenvolvimento<sup>68</sup>. O melanoma geralmente tem bom prognóstico, com altas possibilidades de cura, quando diagnosticado em estádio inicial, razão por que a prevenção e o diagnóstico precoce assumem um importante papel.

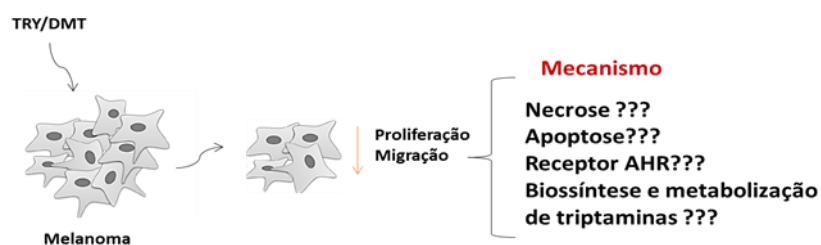
A compreensão dos eventos bioquímicos e moleculares relacionados com o desenvolvimento e a progressão do tumor contribuem para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Para o estudo bioquímico dos melanomas, é comum a utilização

de linhagens celulares, neste estudo foram utilizadas duas linhagens de melanoma humano: SK-Mel-147 e SK-Mel-19.

### *3. OBJETIVOS*

---

Descrever a via metabólica das triptaminas em linhagens de melanomas (SK-Mel-147 e SK-Mel-19) e determinar a inter-relação da via com demais rotas de degradação do Trp, bem como avaliar os efeitos de TRY e DMT na proliferação de melanomas e sobre a relação desses com o sistema imunológico, identificando possíveis mecanismos de ação antitumoral.



### 3.1. Objetivos específicos

#### Capítulo I – *Efeitos da via das triptaminas em linhagens de melanomas*

##### Em linhagens de melanomas humanos (SK-Mel-147 e SK-Mel-19):

- Avaliar o efeito da adição de TRY e DMT nas rotas de metabolização de Trp para verificar como a via das triptaminas interfere nas demais rotas catabólicas do aminoácido;
- Avaliar o efeito dose resposta de TRY e DMT no ensaio clonogênico buscando verificar qual a dose necessária para obter o efeito de inibição da proliferação de melanomas e comparar com os efeitos produzidos pela adição de KYN;

- Investigar os mecanismos de morte celular associados a adição dos metabólitos;
- Determinar os efeitos de TRY, DMT e KYN no ciclo celular;
- Avaliar os efeitos de TRY, DMT e KYN sobre a invasão de melanomas.

**Capítulo II – *Efeitos imunomediados da via das triptaminas em melanomas***

**Em uma condição de co-cultura (melanoma + células do sistema imune originadas do isolamento de células mononucleares de sangue periférico humano [PBMC]):**

- Determinar se TRY, DMT, IAA e KYN afetam a capacidade citotóxica do sistema imunológico contra as células tumorais;
- Analisar como se comporta os metabolismo do triptofano na condição de co-cultura;
- Verificar se o perfil de excreção de algumas citocinas imunomodulatórias é afetado pelos metabólitos da via das triptaminas e pela KYN.

**Capítulo III – *Estudo do receptor de aril hidrocarbonetos***

- Verificar se as linhagens tumorais estudadas expressam o receptor de aril hidrocarbonetos;
- Avaliar se os efeitos biológicos produzidos por TRY e DMT podem ser decorrentes da ligação destes metabólitos no receptor;
- Determinar se DMT é um possível ligante do receptor de aril hidrocarbonetos.

## *4.CAPÍTULO I*

---

### ***EFEITOS DA VIA DAS TRITPTAMINAS EM LINHAGENS DE MELANOMAS***

## **EFEITOS DA VIA DAS TRITPTAMINAS EM LINHAGENS DE MELANOMAS**

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostram que a via das triptaminas é ativa em melanomas e que os metabólitos TRY e DMT reduzem a proliferação destas células <sup>6,21</sup>. O presente capítulo tem como objetivo expandir os dados sobre o metabolismo da via das triptaminas e determinar a inter-relação da via com as demais rotas de degradação do Trp. Avaliamos também os efeitos biológicos de TRY e DMT nas linhagens estudadas.

### ***4.1. Materiais e Métodos***

#### ***4.1.1. Cultivo celular***

As linhagens celulares de melanoma humano SK-Mel-147 e SK-Mel-19 foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Silvya Stuchi Maria-Engler (FCF-USP). Em alguns experimentos foi utilizada também a linhagem de melanomas murino B16F10 (B16), doada pelo Prof. Dr Luiz Rodolpho Raja Gabaglia Travassos (Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia - UNIFESP).

As células foram cultivadas a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, em frascos plásticos descartáveis (Corning®). Para o cultivo foi utilizado meio DMEM (Gibco®, Life Technologies) com 10% de soro fetal bovino (SFB), estoques celulares foram

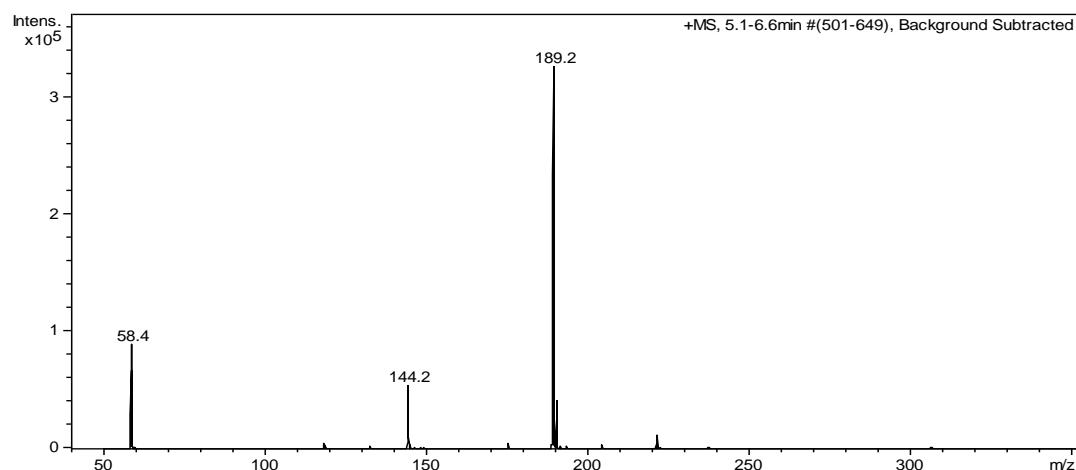
mantidos em meio de cultivo contendo 10% de DMSO e 30% de SFB, em freezer com temperatura de -80°C.

#### *4.1.2. Síntese e purificação da DMT*

A síntese da DMT foi realizada no Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas (FCF-USP), a partir de triptamina comercial. Uma solução de formaldeído (7,5 mL) em metanol (MeOH) (7,5 mL) e uma solução de boroidreto de sódio (0,9 g) em água ( $H_2O$ ) (15 mL) foram adicionadas gota a gota, simultaneamente, em uma solução de triptamina (0,8004 g) em MeOH (35 mL) resfriado a 0°C, com banho de gelo e agitação constante. A solução foi agitada em banho de gelo por 30 min. Em seguida, ácido clorídrico 4 M foi adicionado vagarosamente até que se obtivesse valor de pH 3, e a mistura resultante foi agitada por 10 minutos. O pH foi ajustado para 6,5-7,0 com bicarbonato de sódio, o MeOH foi evaporado e acrescentou-se  $H_2O$  (50 mL). A mistura foi lavada com acetato de etila (EtOAc) (3 X 50 mL). No intuito de retirar a água do sistema adicionou-se sulfato de magnésio. A mistura foi filtrada e novamente lavada com EtOAc. A fase orgânica foi seca e obteve-se um sólido marrom.

A purificação se deu por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em coluna preparativa Luna C18 (250 x 10 mm, 5 $\mu$ m, ®Phenomenex), usando como fase móvel EtOAc: MeOH (70:30) + 0,1% trietilamina, em método isocrático. O material foi coletado por coletor automático e posteriormente seco em rotavapor. O produto da síntese, depois de purificado foi analisado em LC/MS do tipo *ion trap* por uma fonte de

ionização por *electrospray*, operada no modo positivo (ESI+) (Figura 6). O produto obtido apresentou pureza superior a 90%.



**Figura 6:** Espectro de massas do DMT após a purificação, análise em LC/MS do tipo *íon trap* por uma fonte de ionização por *electrospray*.

A quantificação do material obtido foi feita diante da pesagem do precipitado formado após a secagem do solvente em que estava dissolvido. Um microtubo estéril foi inicialmente pesado e, após a secagem do material em SpeedVac®, pesado novamente, sendo a diferença de peso correspondente à massa de DMT em solução. De posse desse valor, foram feitas soluções de 50 mM em metanol que permaneceram estocadas sob refrigeração (8 °C) e protegidas da luz.

#### *4.1.3. Ensaios celulares e DMT*

Para a realização dos ensaios celulares, uma alíquota do estoque de DMT em metanol foi seca em SpeedVac® e solubilizada novamente em dimetilsulfóxido (DMSO) levando a uma concentração máxima de DMSO por ensaio de 0,2%. Nesta concentração de solvente não houve citotoxicidade para nenhuma das células estudadas.

#### *4.1.4. Extração e detecção dos metabólitos do Trp em culturas celulares*

##### *4.1.4.1. Desenho experimental*

Para o estudo do metabolismo as células SK-Mel-147 ( $2,5 \times 10^5$  células/poço) e SK-Mel-19 ( $3,5 \times 10^5$  células/poço) foram plaqueadas em placa de 6 poços em 1,5 mL de meio DMEM contendo 10% de SFB. TRY, DMT e KYN (100  $\mu\text{M}$ ), foram adicionados ao meio de cultura e os estímulos permaneceram em contato com as células por 24 horas.

##### *4.1.4.2. Extração dos metabólitos*

O sobrenadante das culturas (500  $\mu\text{L}$ ) foram adicionados a um microtubo de 2 mL contendo 1,5 mL de metanol gelado. Após a adição da amostra, 10  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque de padrão interno (MLT-D7 417,9 nM, TME 5  $\mu\text{M}$  e HIAA-D2 5  $\mu\text{M}$ ) em metanol foram adicionados aos microtubos, que foram vortexados por 1 min, e armazenados por 1 h a – 20°C para total precipitação das proteínas do meio de

cultura. Posteriormente, os microtubos foram submetidos a centrifugação a 14.000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante dos microtubo foi separado e filtrado em placa *Phree Phospholipid Removal* (Phenomenex, EUA) para remoção de proteínas e fosfolipídeos da amostra. As amostras foram transferidas para um tubo de vidro e secas sob atmosfera de gás nitrogênio, sendo reconstituídas em 100 µL de uma mistura de água: metanol (9:1) contendo 0,1% de ácido fórmico.

A fim de elucidar também o metabolismo de Trp intracelular, as células foram lavadas três vezes com tampão PBS e foram adicionados 500 µL de metanol e 10 µL da solução de padrão interno aos poços. As células foram lisadas por raspagem com uso de rodo (Scraper SPL Life Sciences). O material obtido foi coletado e os poços foram lavados com mais 500 µL de metanol gelado. Assim, todas as células foram vortexadas por 1 min, centrifugadas e tratadas da mesma forma que as amostras de sobrenadante da cultura celular.

#### *4.1.4.3. Instrumentação analítica para o estudo do metabolismo do Trp*

Para o estudo do metabolismo de triptofano, realizamos uma colaboração com o Prof. Dr. Ernani Pinto e sua aluna de doutorado Ariane Rivellis Julio que desenvolveu e validou uma metodologia bioanalítica para quantificação de metabólitos do triptofano em nosso departamento. Os dados obtidos no processo de validação serão apresentados excepcionalmente na tese da respectiva aluna.

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

**Tabela 1:** Parâmetros da otimização dos analitos de interesse: íon precursor (m/z), íon produto (m/z), fragmentor e energia de colisão (V).

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

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

O método cromatográfico foi realizado em um gradiente de eluição com 10 mM de formiato de amônio e 0,5 % de ácido fórmico, pH 2, em água MilliQ (Millipore) (A) e ACN (B). O volume de injeção foi de 10  $\mu$ L e a vazão utilizada durante toda a cromatografia foi de 0,2 mL.min<sup>-1</sup> na coluna Luna C18(2) (150 mm x 2 mm, 3  $\mu$ M, Phenomenex). O gradiente de eluição utilizado foi: (i) 0 - 15.00 min (100(A):0(B) – 5(A):95(B)), (v/v); (ii) 15.00 – 16.00 min (5(A):95(B)), (v/v); (iii) 16.00 – 17.00 min ((5(A):95(B) – 100(A):0(B)), (v/v); (iv) 17.00 – 22 min (100(A):0(B)), (v/v), para reequilibrar a coluna.

#### *4.1.5. Ensaio clonogênico*

O ensaio clonogênico apresentado neste capítulo foi realizado com os melanomas SK-Mel-147 e SK-Mel-19. Antes do tratamento, 300 células foram semeadas em placas de 6 poços e cultivadas durante 24 h. As células foram expostas a concentrações de 5; 10; 25; 50 e 100  $\mu$ M TRY; DMT ou KYN e o meio de cultura contendo o tratamento foi substituído a cada 48 h. As células foram cultivadas por 15 dias até a formação de colônias. No 15º dia, as culturas foram fixadas com glutaraldeído (6,0% v/v) e coradas com violeta de cristal (0,5% g/v).

#### *4.1.6. Ensaio de viabilidade celular por citometria de fluxo*

As células SK-Mel-147 ( $9 \times 10^4$  células/poço) e SK-Mel-19 ( $3,5 \times 10^5$  células/poço) foram semeadas em placas de 6 poços em meio DMEM com 10% de SFB e após atingirem 50% de confluência, foram estimuladas com TRY, DMT ou KYN (100  $\mu\text{M}$ ) por 48 horas. Após este período as células foram tripsinizadas e incubadas com anexina V (Invitrogen) conjugada com APC e com PI. A viabilidade celular das linhagens de melanoma foi analisada por citometria de fluxo (FACS Calibur; Becton-Dickinson) onde foi medido apoptose e necrose. A porcentagem de células em processo de necrose e apoptose foram analisadas utilizando o software FlowJo.

#### *4.1.7. Análise de ciclo celular*

As células SK-Mel-147 ( $9 \times 10^4$  células/poço) e SK-Mel-19 ( $3,5 \times 10^5$  células/poço) foram semeadas em placas de 6 poços em meio DMEM com 10% de SFB e após atingirem 50% de confluência, foram estimuladas com TRY (10  $\mu\text{M}$ ), DMT (50  $\mu\text{M}$ ) ou KYN (50  $\mu\text{M}$ ) por 48 horas. Após o tempo de incubação com os estímulos, as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas. Para o ensaio de ciclo celular, elas foram ressuspensas em solução contendo 1mg/mL de Iodeto de Propídio (PI), 0,1% de citrato de sódio e 0,1% de Triton X-100. A proporção de células em cada fase do ciclo celular foi determinada por citometria de fluxo e os dados foram analisados utilizando o software FlowJo.

#### *4.1.8. Ensaio de Invasão*

Insertos ou câmaras de invasão (*transwell*), contendo filtros de policarbonato de 8 µm (353090; BD Biosciences) foram revestidos na superfície superior com Matrigel (354234, BD Biosciences) diluído 1:10 em meio de cultura. As linhagens celulares SK-Mel-147 e SK-Mel-19 foram ressuspensas em DMEM com 2% de SFB, estimuladas com TRY (10 µM), DMT (50 µM) ou KYN (50 µM) e adicionadas à câmara superior. No compartimento inferior, foi adicionado meio DMEM com 2% de SFB. As células foram incubadas por 48 horas e, após este tempo, as células da superfície superior do filtro foram completamente removidas com um *swab*. As células que atravessaram o Matrigel e atingiram a superfície inferior do filtro foram fixadas com glutaraldeído a 5%, coradas com azul de toluidina e contadas em microscópio ótico com ampliação de 200x e zoom de 2,4.

#### *4.1.9. Determinação da atividade das metaloproteinases de matriz 2 e da concentração dos inibidores teciduais de MMPs 1 e 2*

Placas de 24 poços foram recobertas com Matrigel® (diluição 1:10) e as linhagens de melanoma foram semeadas em meio DMEM com 2% de SFB. As células foram estimuladas com TRY (10 µM), DMT (50 µM) ou KYN (50 µM) por 48 horas e a atividade das MMP-2 bem como a concentração dos TIMP-1 e TIMP-2 foram determinadas no sobrenadante utilizando kits Biotrak e kits de ELISA (GE Healthcare,

Buckinghamshire, UK), respectivamente, de acordo com instruções do fabricante. Os valores foram calculados utilizando curva padrão fornecida pelo kit.

#### *4.1.10. Análise estatística*

A análise estatística para todos os experimentos foi realizada comparando-se os dados obtidos com os tratamentos em relação ao controle, por meio de teste *t*. Foram considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ .

### **4.2. Resultados e Discussão**

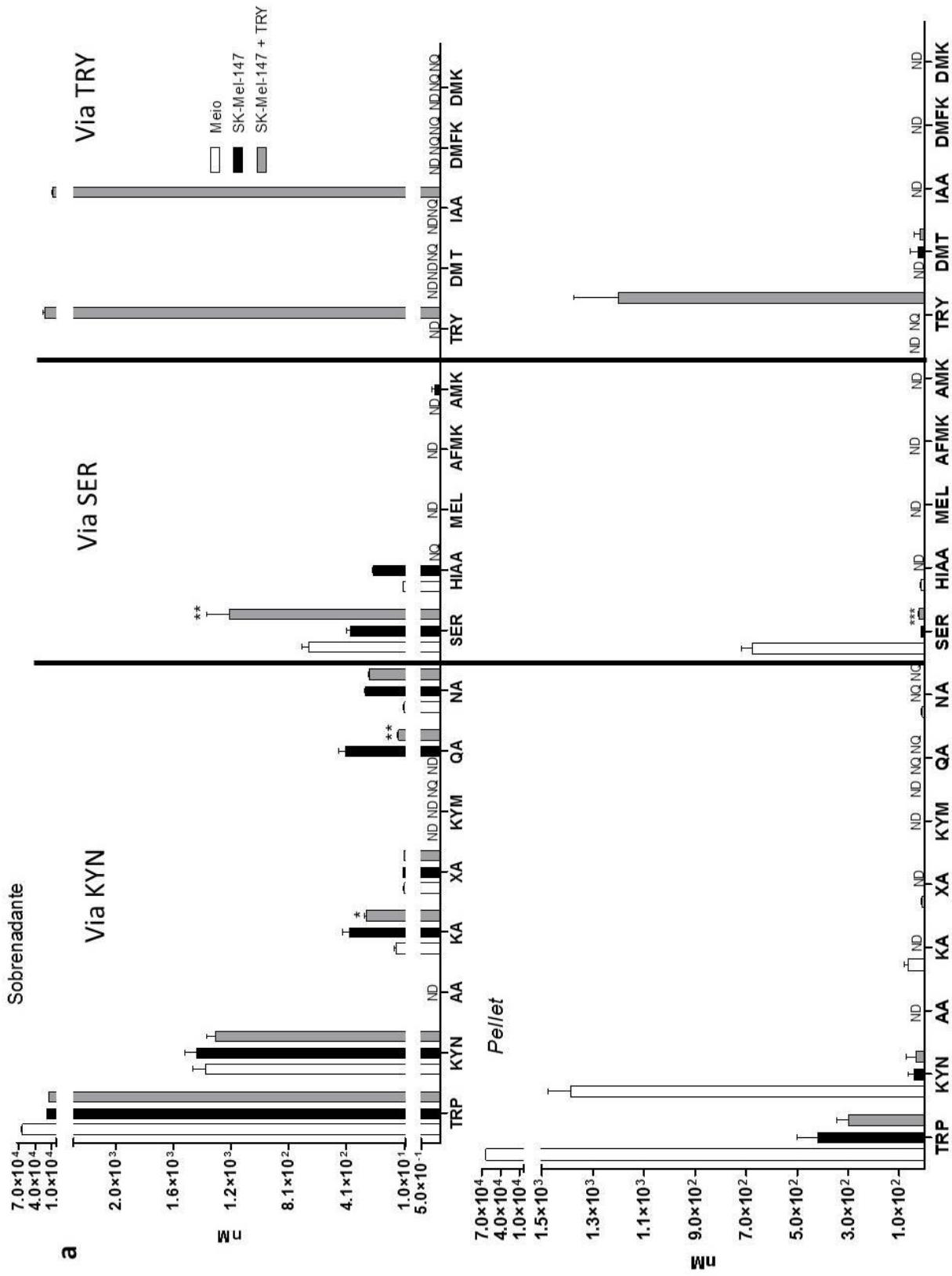
#### *4.2.1. Via das triptaminas e demais rotas de degradação do Trp*

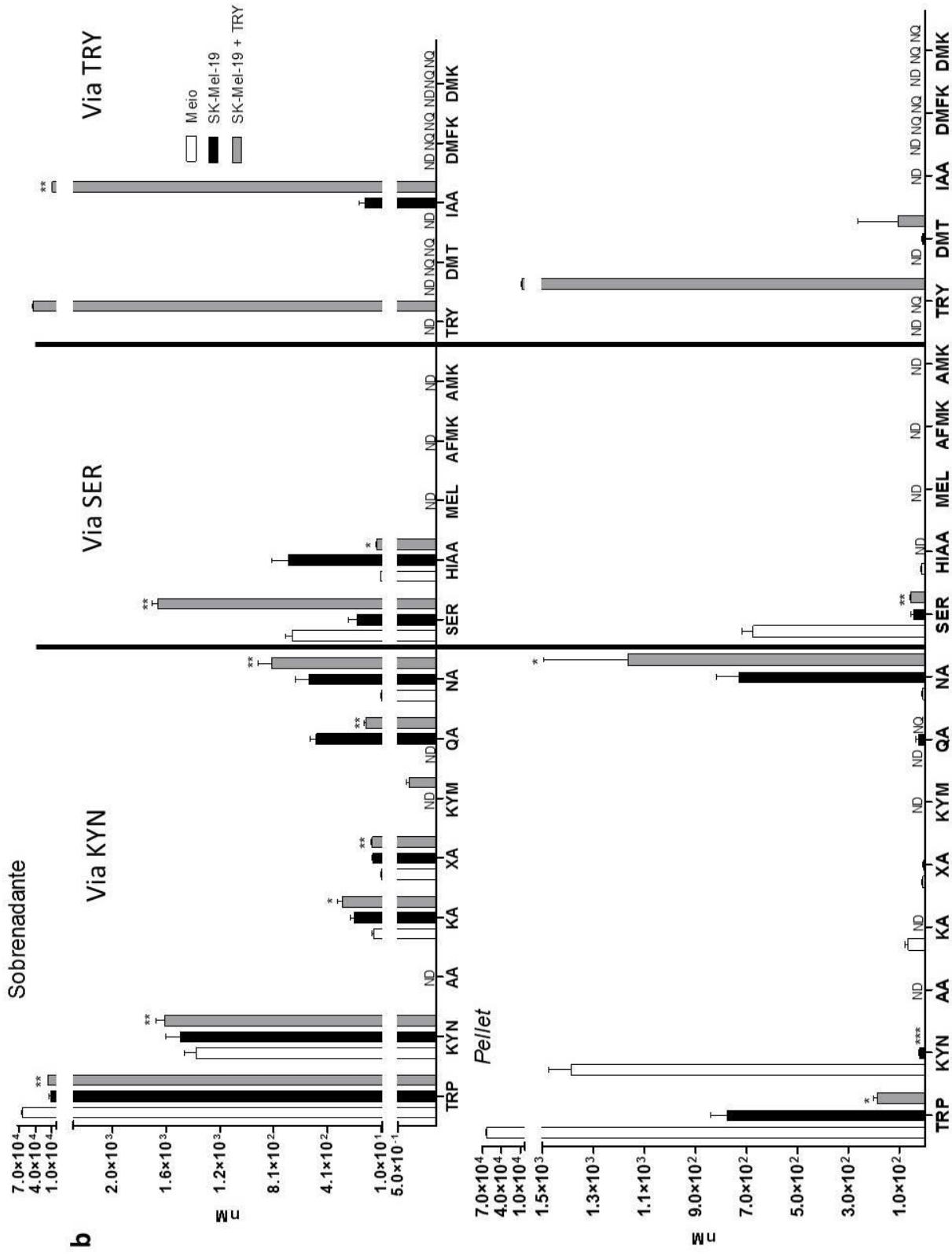
Sabe-se que as rotas de degradação do Trp se inter-relacionam e que metabólitos produzidos por uma determinada via podem impactar nas demais aumentando ou inibindo a formação de compostos<sup>5; 69</sup>. Durante o mestrado, mostramos que a via das triptaminas é ativa nas linhagens de melanoma SK-Mel-147 e SK-Mel-19<sup>6</sup>, agora, procuramos estudar o metabolismo de forma mais ampla, determinando o impacto da presença de TRY e DMT exógena na formação de metabólitos de todas as vias de degradação do Trp. Foram avaliados tanto os metabólitos secretados para o meio extracelular (sobrenadante) quanto os não secretados (*pellet*). O estudo foi realizado também na linhagem de melanoma murino B16 devido a possibilidade de futuros projetos do nosso grupo de pesquisa envolvendo estudos do metabolismo do TRP em

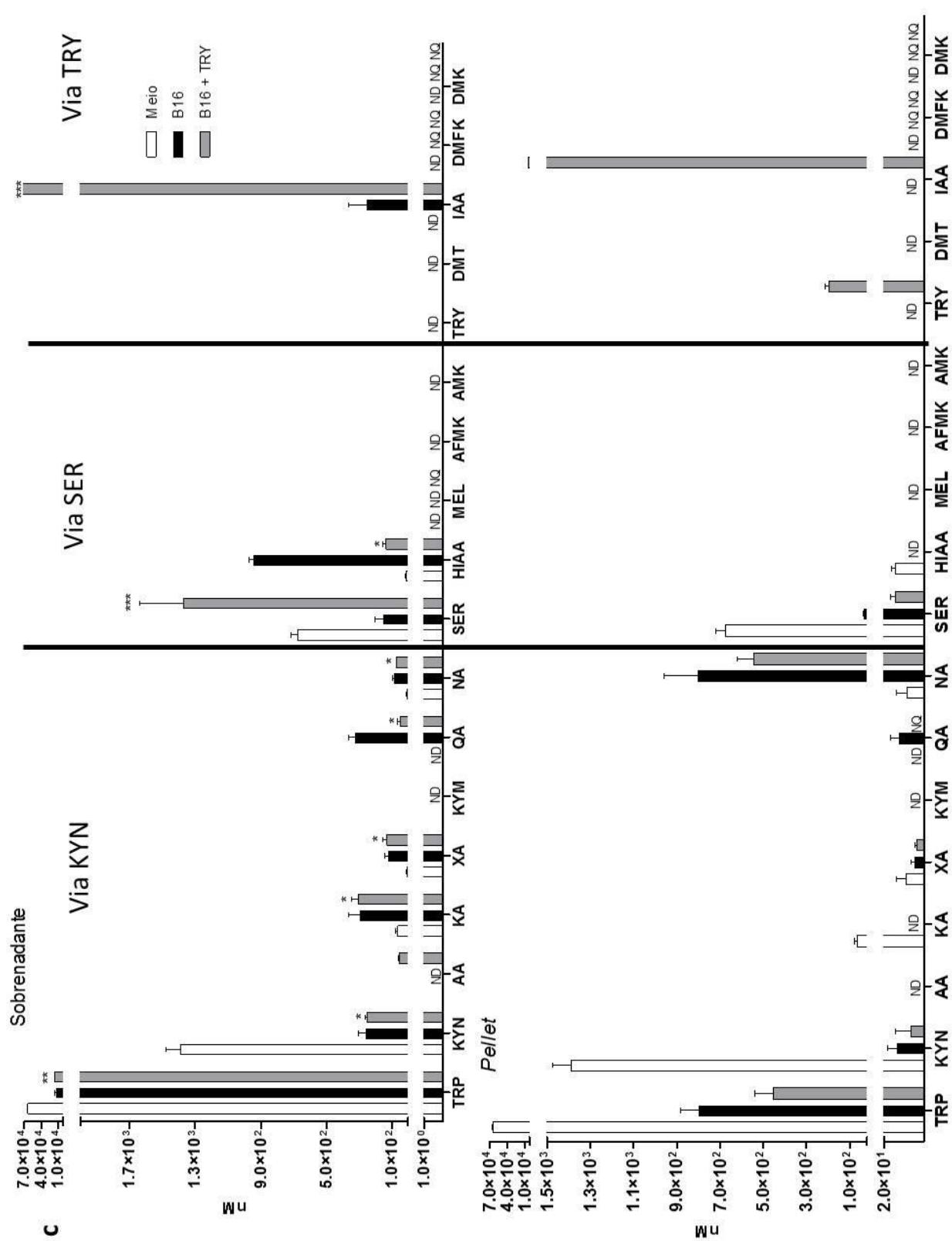
modelos animais. Avaliamos ainda como as células se comportam frente a adição de KYN, metabólito mais abundante do Trp. Para facilitar a análise, os dados serão apresentados em sessões distintas.

#### *4.2.1.1.Efeito da adição de TRY no metabolismo do triptofano em melanomas*

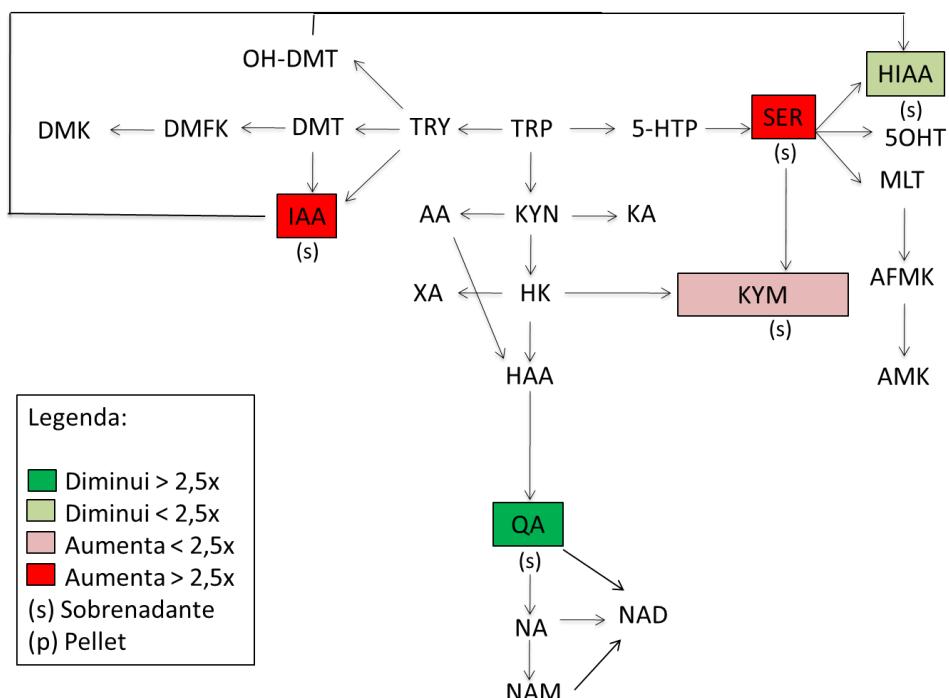
Quando as células são tratadas com TRY percebemos que em todas as linhagens estudadas a via KYN é alterada de modo a sintetizar uma quantidade menor do metabólito ácido quinolínico (QA) (Figura 7D). O QA produzido pelas células tumorais é utilizado para síntese de nicotinamida adenina nucleotídeo (NAD), essencial para o crescimento tumoral. O acúmulo de QA foi recentemente associado com o fenótipo maligno em gliomas humanos<sup>70</sup>. Dados anteriores obtidos no mestrado demonstram que quando as células de melanomas SK-Mel-147 e SK-Mel-19 são incubadas com TRY, existe uma redução na proliferação das mesmas<sup>6</sup>, a redução da concentração de QA nesta condição poderia ser uma explicação metabólica para o fenômeno observado.







D Efeito da adição de TRY em melanomas



**Figura 7:** Efeito da adição de TRY (100 µM) em melanomas SK-Mel-147 (A); SK-Mel-19 (B); B16 (C). As células foram tratadas e incubadas por 24 h. No painel (D), são descritas as alterações nas vias de degradação do Trp que foram comuns nas células estudadas. ND: não detectável; NQ: não quantificável. (\*) P <0,05; (\*\*) P <0,01; (\*\*\*) P <0,001.

Para a via serotonérgica, o que pode se destacar é o aumento nas concentrações de SER e a redução de HIAA observada em todas as linhagens analisadas (Figura 7D). Dados referentes ao mestrado indicam que TRY não modifica a expressão da enzima triptofano hidroxilase (TPH), responsável pela síntese de SER<sup>6</sup>. Devido à similaridade estrutural dos compostos TRY e SER, acreditamos que seja possível haver a hidroxilação de TRY na posição 5 do anel, formando assim, SER. Estudos realizados

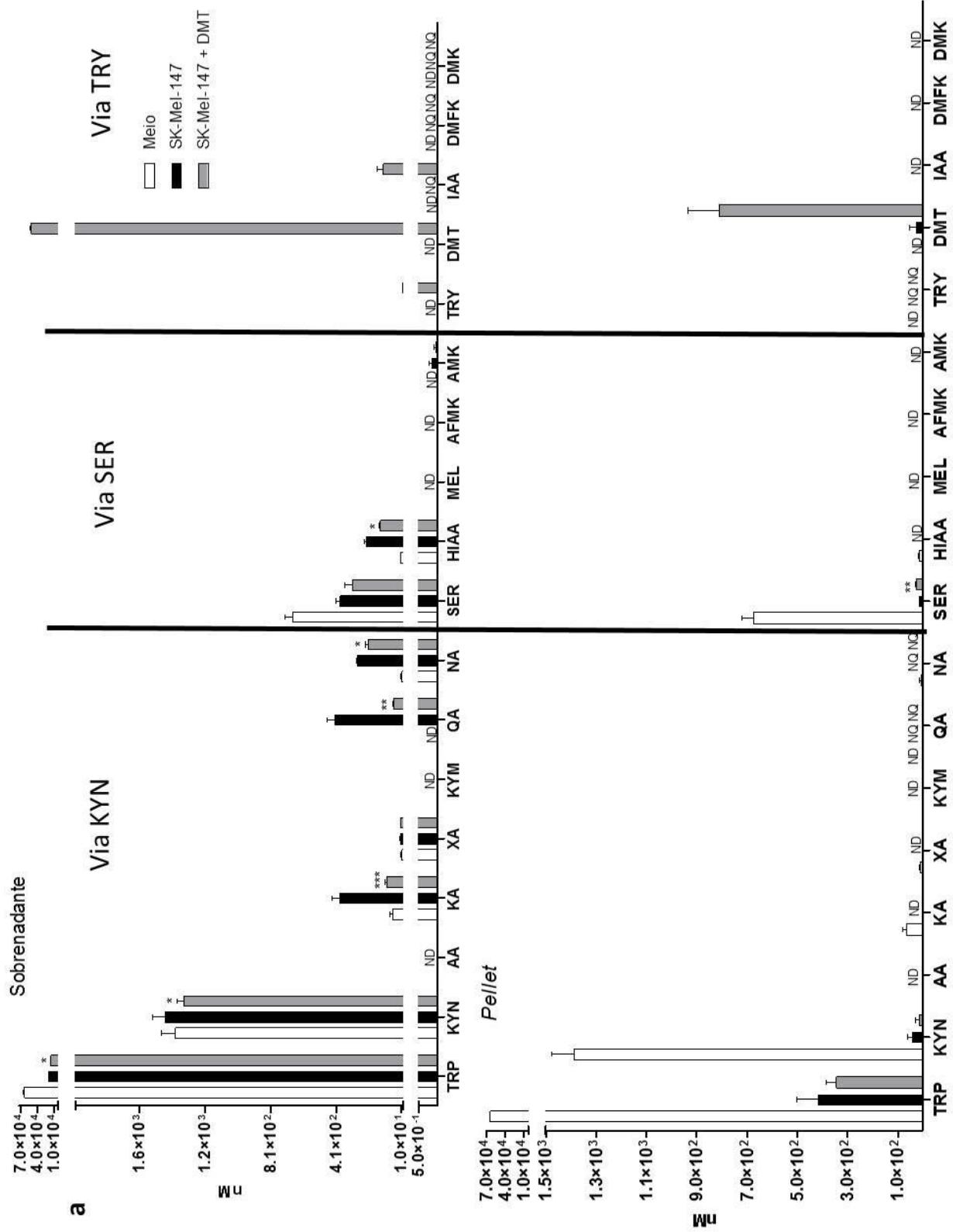
em células vegetais já demonstraram que está via de formação de SER é ativa no reino vegetal, através da atuação da enzima triptamina 5-hidroxilase. A mesma via enzimática também é ativa em bactérias, porém, o processo nunca foi descrito em mamíferos<sup>71;72</sup>. Uma vez que a SER é metabolizada a HIAA e este último apresenta-se com uma concentração reduzida, uma outra possibilidade é que o aumento de SER poderia ser devido a redução da metabolização da molécula por esta via, isto também explicaria as concentrações elevadas de KYM encontradas, já que a rota de metabolização do composto poderia estar sendo deslocada no sentido de formação deste produto.

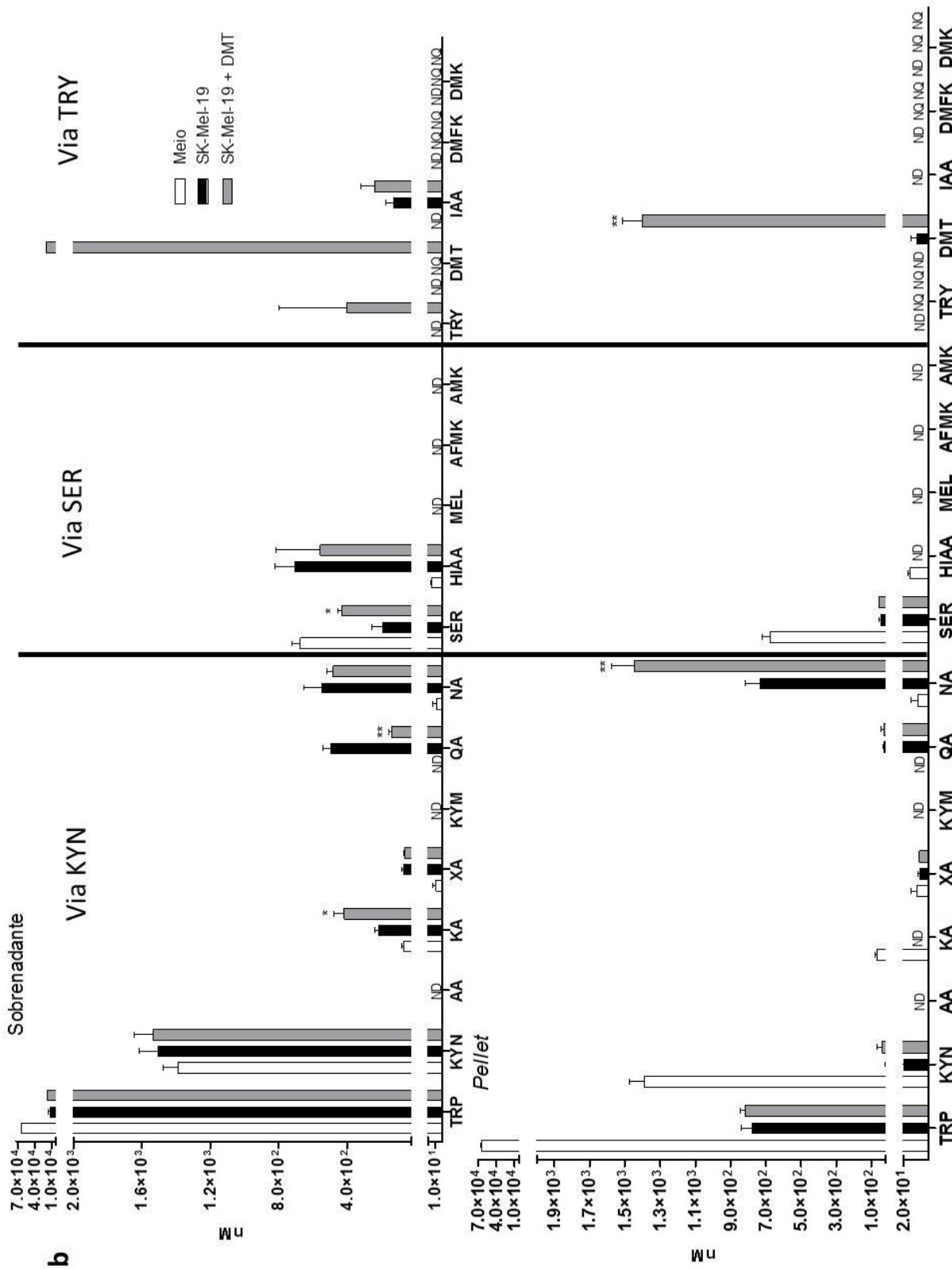
Na via das triptaminas a síntese de IAA é exacerbada (Figura 7D). Porém, IAA não é um metabolito exclusivo de TRY: a metabolização de outros compostos como SER e DMT, também sofrem a ação da enzima monoamina oxidase (MAO) e acarretam na síntese de IAA<sup>20</sup>. Desta forma, o aumento de IAA pode ser explicado pela maior disponibilidade de metabólitos para ser degrada pela MAO.

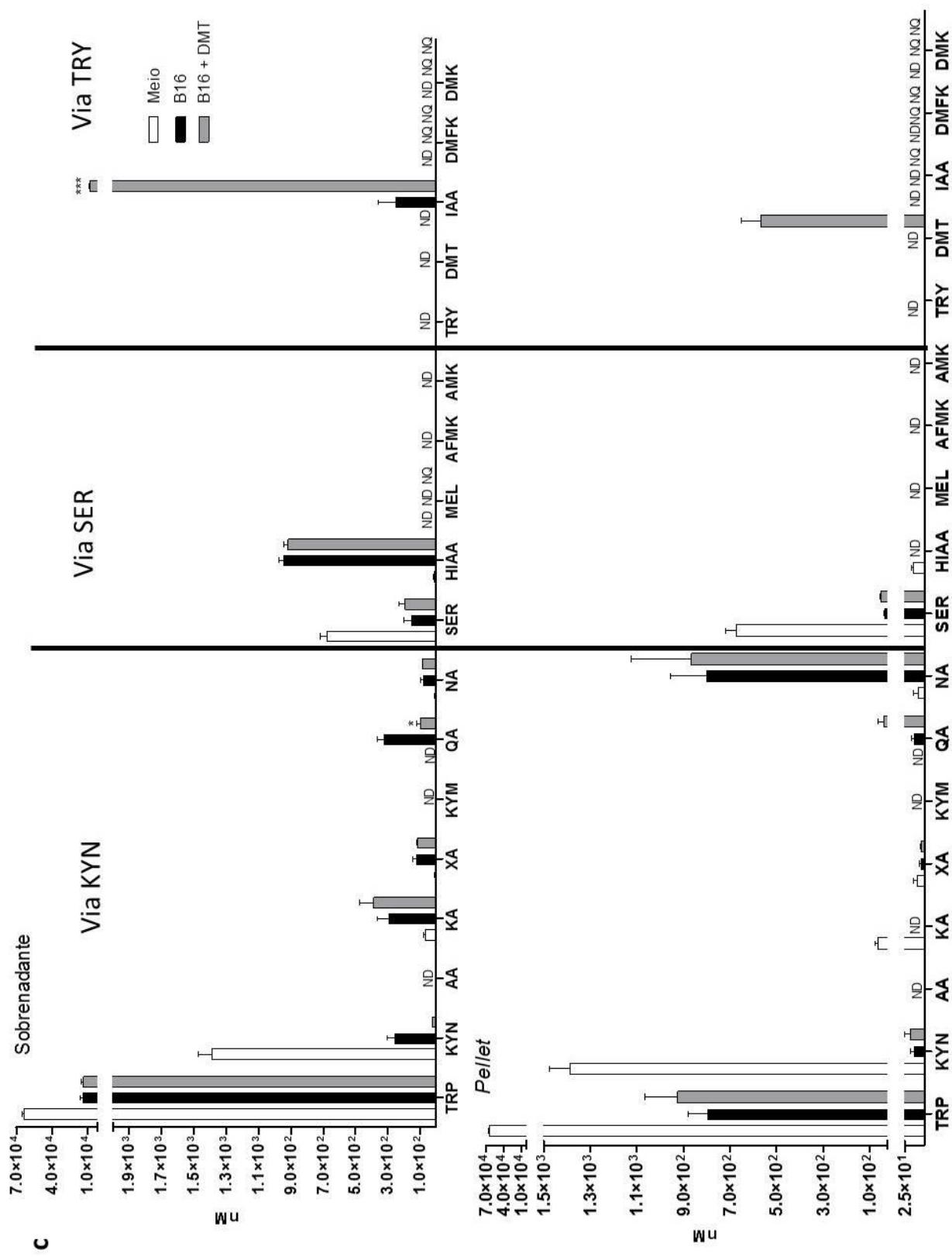
#### *4.2.1.2. Efeito da adição de DMT no metabolismo do triptofano em melanomas*

Ao tratarmos as células com DMT, percebemos um perfil semelhante ao que acontece com a adição de TRY, para as três linhagens estudadas, a redução na síntese de QA é mantida (Figuras 8A, 8B e 8C). Ainda, o tratamento com DMT reduziu a concentração de KYN na linhagem SK-Mel-147 (Figura 8A), corroborando com dados

anteriores do nosso grupo de pesquisa onde foi demonstrada a redução nas concentrações de KYN em gliomas tratados com DMT, neste estudo o efeito foi atribuído a inibição da enzima IDO<sup>5</sup>. A redução de alguns metabólitos subsequentes a via das quinureninas poderia ser explicada menor disponibilidade de KYN.

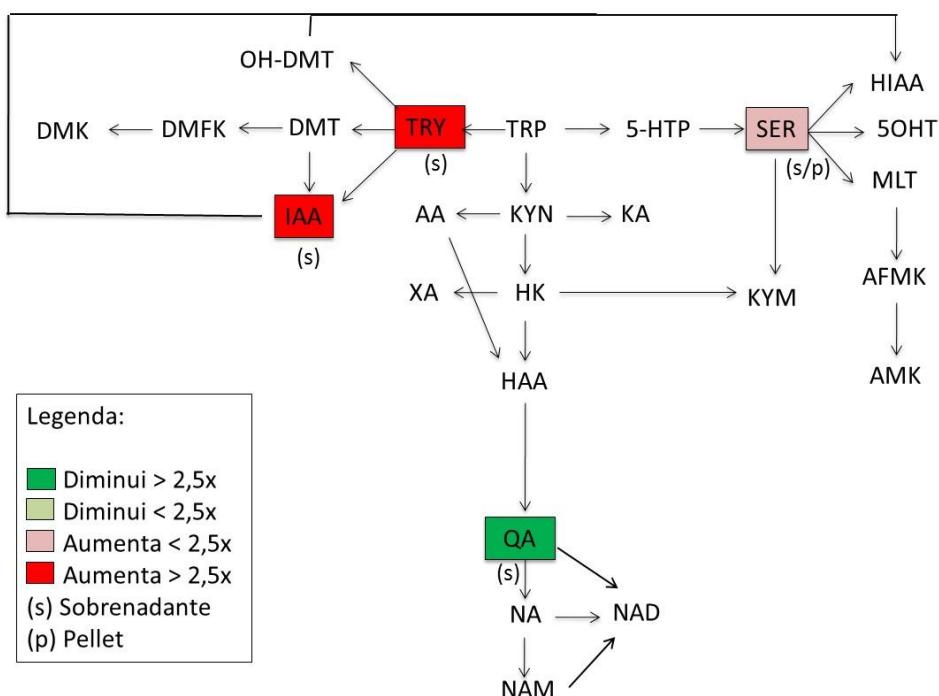






D

## Efeito da adição de DMT em melanomas



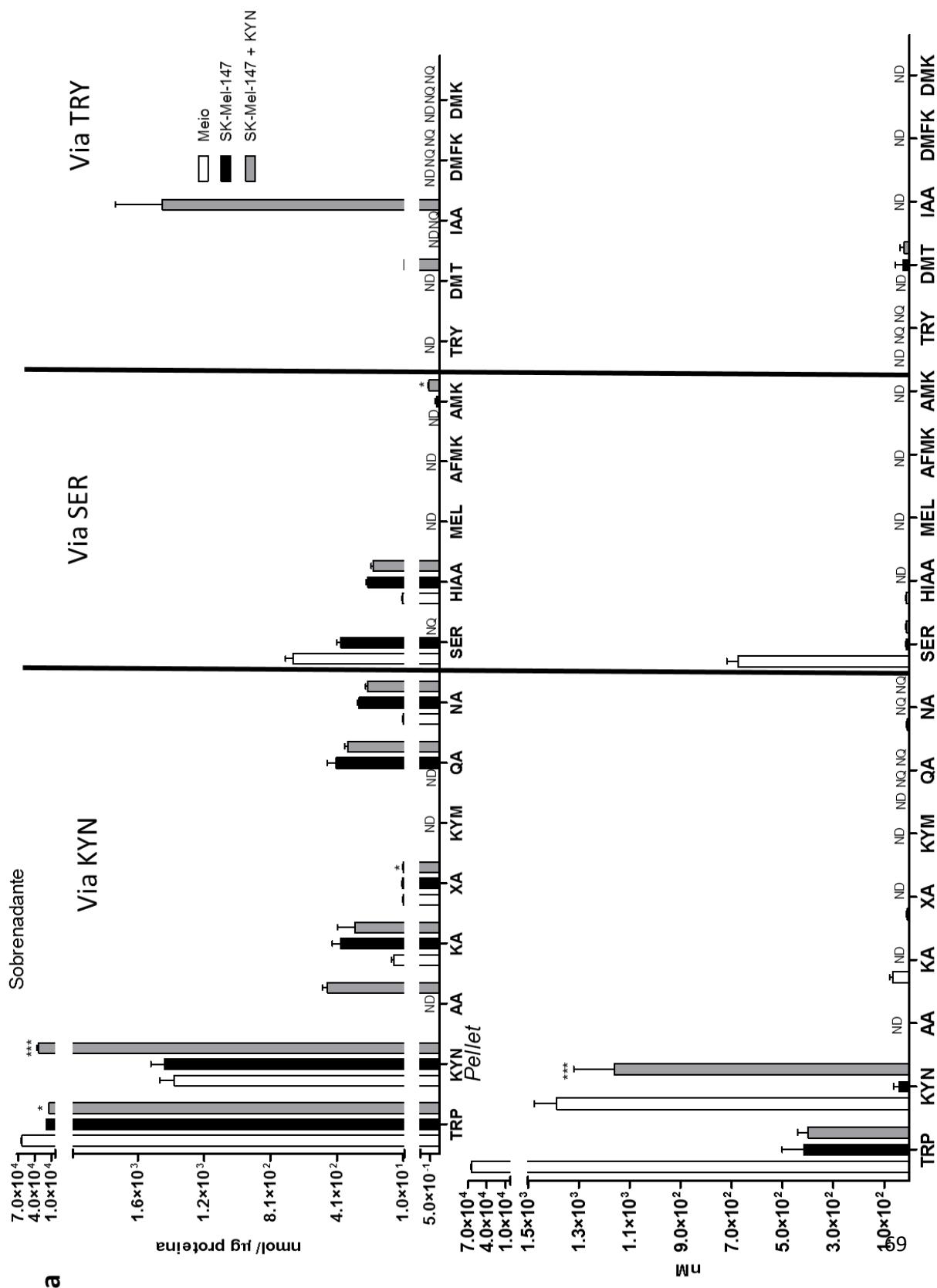
**Figura 8:** Efeito da adição de DMT (100 µM) em melanomas SK-Mel-147 (A); SK-Mel-19 (B); B16 (C). As células foram tratadas e incubadas por 24 h. No painel (D), são descritas as alterações nas vias de degradação do Trp que foram comuns nas células estudadas. ND: não detectável; NQ: não quantificável. (\*) P <0,05; (\*\*) P <0,01; (\*\*\*) P <0,001.

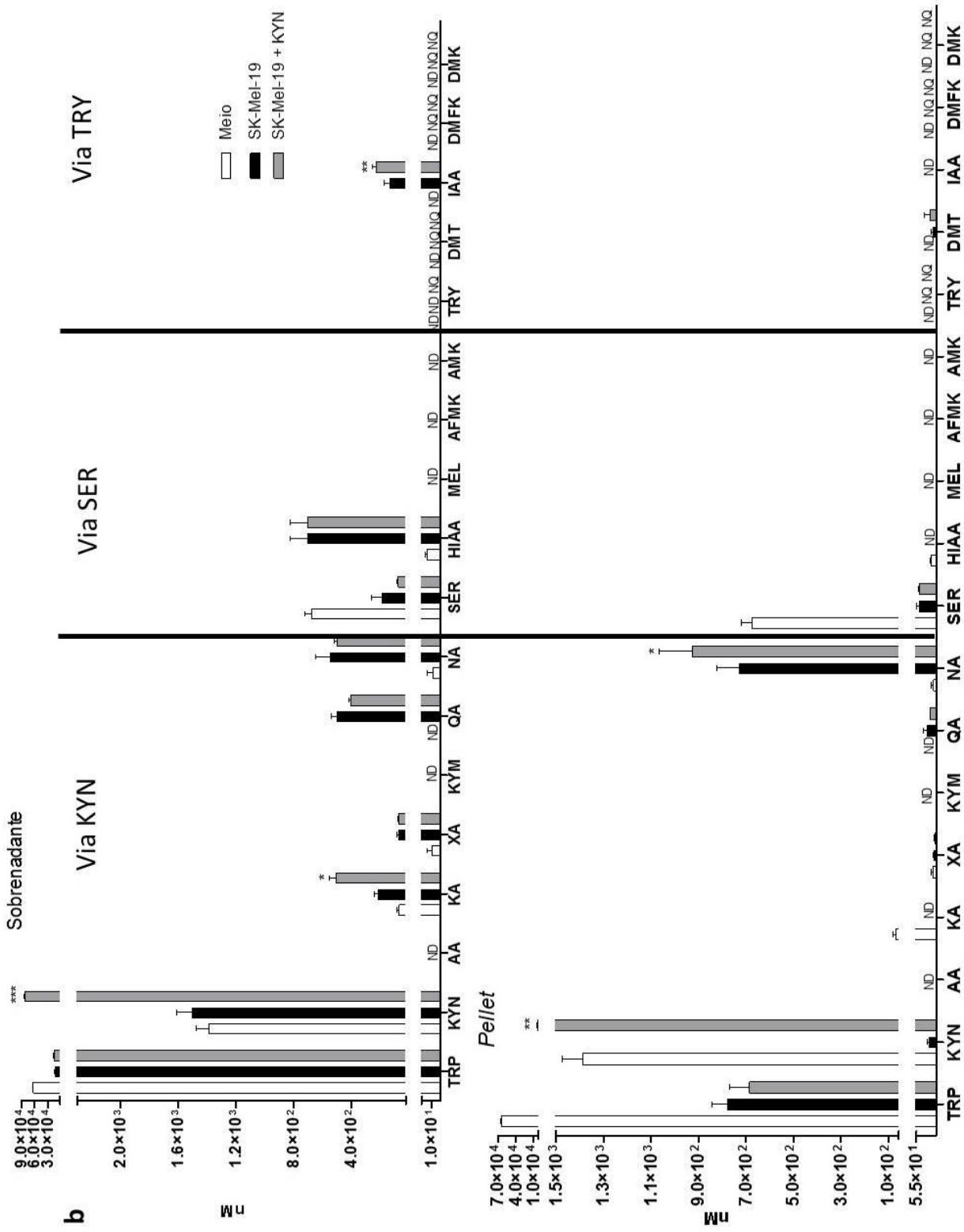
Na via serotoninérgica, observamos que SER está aumentada no *pellet* das células SK-Mel-147 (Figura 8A) e no sobrenadante das células SK-Mel-19 (Figura 8B), este aumento pode estar relacionado com a síndrome serotoninérgica relatada por alguns usuários do chá de Santo Daime. Esta síndrome caracterizada por tremor, diarréia, instabilidade autonômica, hipertermia, sudorese e espasmos musculares foi atribuída inicialmente a presença das β-carbolinas no chá, que ao inibirem competitivamente a enzima MAO, permitem que a SER atue por mais tempo na fenda sináptica<sup>63</sup>. Porém,

nossos resultados demonstram que o próprio DMT pode acarretar no aumento da concentração de SER, contribuindo assim para o desencadeamento da síndrome. Além disso, devido à similaridade estrutural com o neurotransmissor, o DMT também se liga ao receptor 5-HT levando os usuários do chá a experimentarem uma série de alterações cognitivas, sensoriais e emocionais<sup>73</sup>. Com a adição de DMT, o IAA também apresenta-se aumentado nas linhagens SK-Mel-147 e B16 (Figuras 8A e 8C), evento explicado pelo fato de DMT ser um substrato da MAO. Além disso, a síntese TRY é aumentada nos melanomas humanos (Figuras 8A e 8B), mostrando que a via das triptaminas pode caminhar no sentido contrário, onde a DMT origina TRY nestas células. O aumento de TRY, pode ainda ser atribuído ao aumento de expressão da enzima AADC nesta condição, a enzima é responsável pela conversão de Trp em TRY, estes dados foram mostrados em minha dissertação de mestrado<sup>6</sup>.

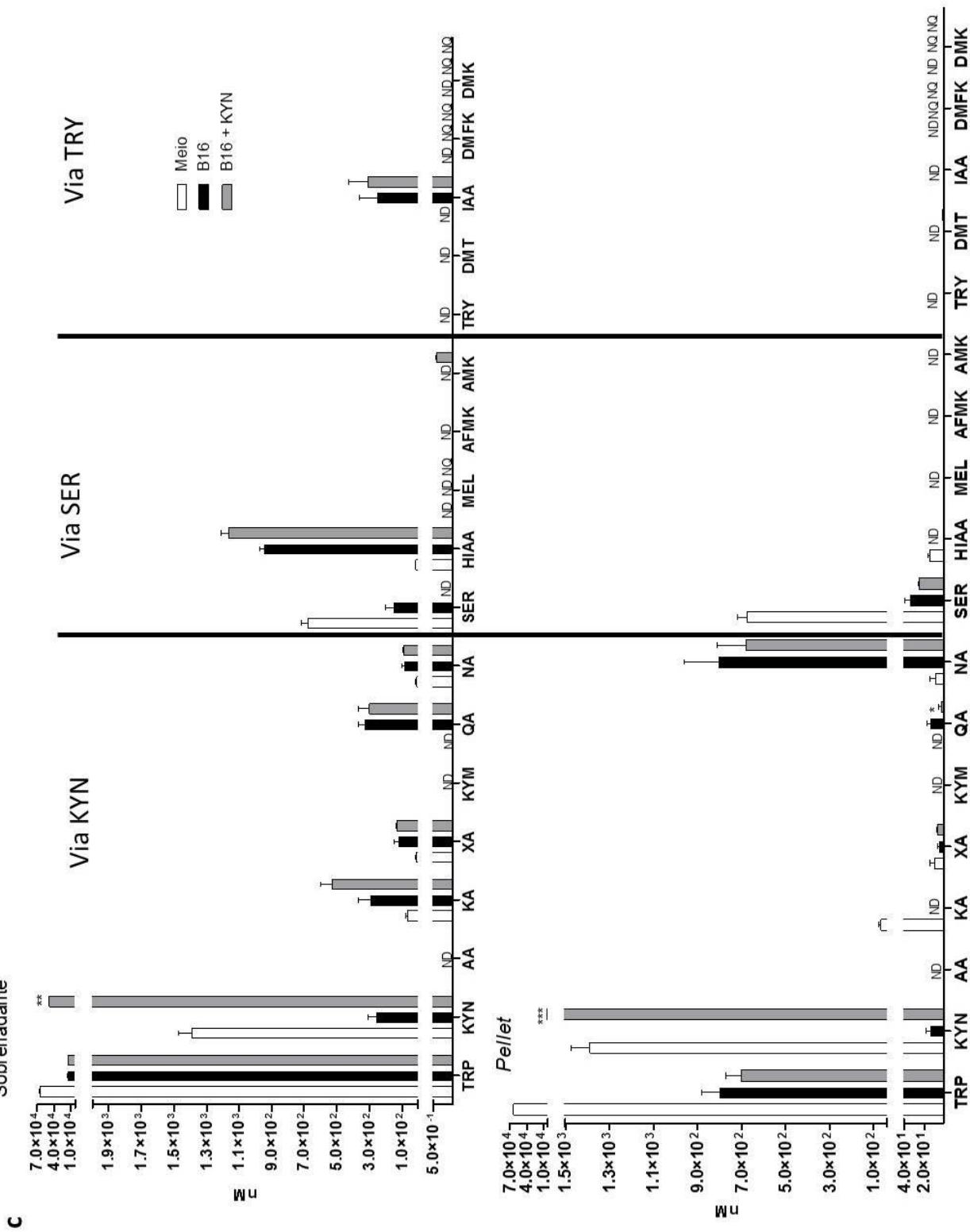
#### *4.2.1.3. Efeito da adição de KYN no metabolismo do triptofano em melanomas*

O sobrenadante das culturas celulares tratadas com KYN foi analisado após 24 h de incubação. As células nesta condição não seguem um padrão de alteração na via das quinureninas, para a SK-Mel-147 (Figura 9A), existe uma maior produção de AA, porém outros metabólitos da via não estão modificados. Já para a SK-Mel-19 (Figura 9B), o KA está alterado e nas células B16 (Figura 9C), a adição de KYN não produz modificações.



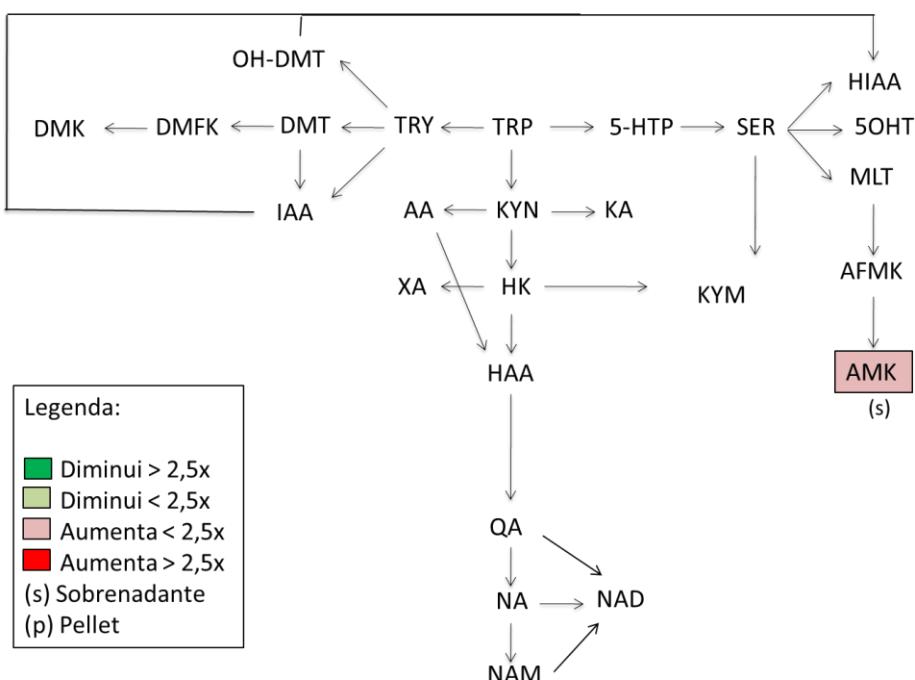


Sobrenadante



D

## Efeito da adição de KYN em melanomas



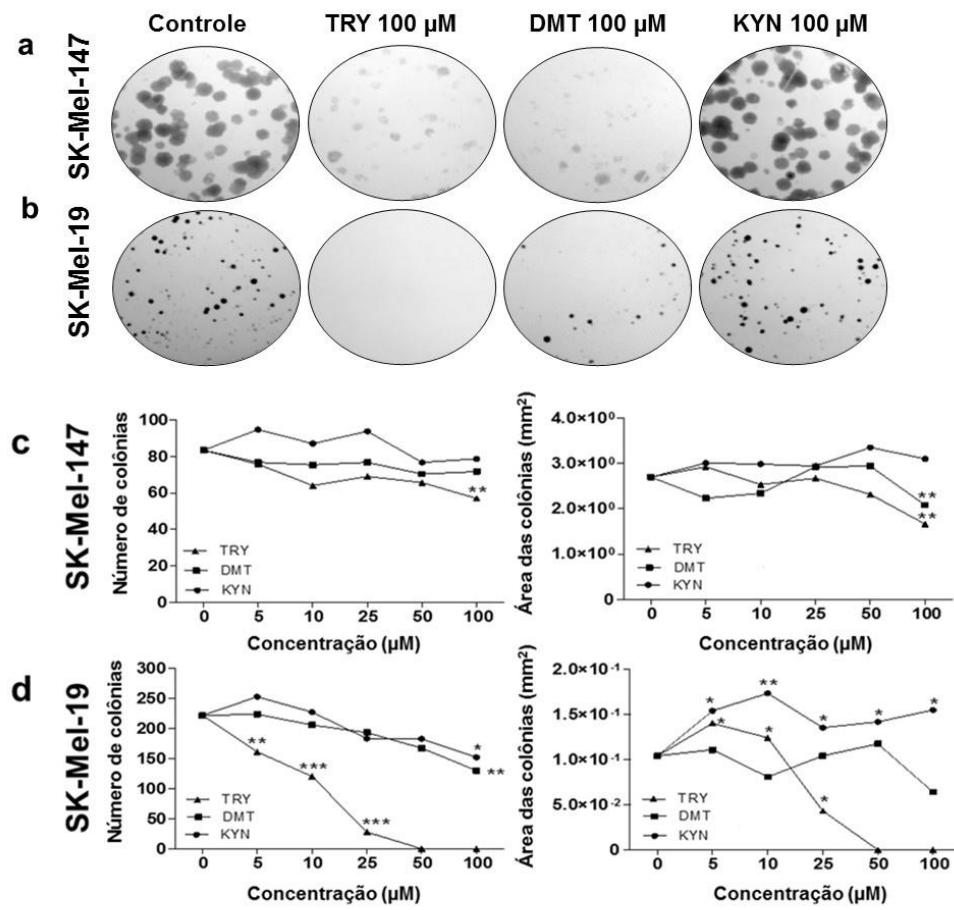
**Figura 9:** Efeito da adição de KYN (100 µM) em melanomas SK-Mel-147 (A); SK-Mel-19 (B); B16 (C). As células foram tratadas e incubadas por 24 h. No painel (D), são descritas as alterações nas vias de degradação do Trp que foram comuns nas células estudadas. ND: não detectável; NQ: não quantificável. (\*) P <0,05; (\*\*) P <0,01; (\*\*\*) P <0,001.

Na via serotonérgica, a adição do composto culmina no aumento de AMK nas linhagens SK-Mel-147 e B16 (Figura 9A, 9C e 9D). Até o momento, não existe nenhum estudo de inibição das enzimas IDO e/ou TDO pela KYN, o *feedback* negativo na via poderia ser uma explicação para o aumento de AMK observado, neste caso a degradação do Trp estaria sendo deslocado no sentido da via serotonérgica levando a formação do produto de abertura do anel indólico AMK. Na via das triptaminas, não houve alterações significativas.

#### *4.2.2. Atividades biológicas de TRY e DMT em melanomas*

##### *4.2.2.1. Ensaio Clonogênico*

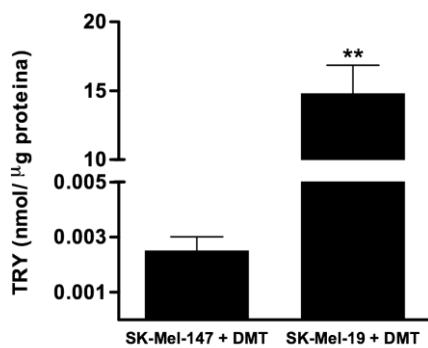
Dados obtidos durante o meu mestrado demonstraram que a clonogenicidade das células de melanoma humano SK-Mel-147 e SK-Mel-19 é afetada quando as mesmas são incubadas com TRY ou DMT na concentração de 100  $\mu\text{M}$ <sup>6</sup>. Dando continuidade ao estudo, realizamos um ensaio clonogênico com concentrações variadas destes compostos a fim de verificar a concentração mínima necessária para a atividade antitumoral (Figura 10). Além disso, KYN também foi utilizada no ensaio devido a descrição recente de que o composto é capaz de exacerbar a proliferação de células de glioblastoma<sup>55</sup>. TRY e DMT diminuíram a proliferação celular em ambas as linhagens testadas, principalmente na concentração anteriormente testada (100  $\mu\text{M}$ ) (Figura 10). A TRY apresentou uma atividade dose-resposta na linhagem SK-Mel-19 e teve maior efeito antitumoral se comparado ao DMT em ambas as células. Para a SK-Mel-147, o potencial antiproliferativo de TRY pode ser observado na redução do número de colônias e na área (Figuras 10A e 10C), enquanto que nas células SK-Mel-19, as colônias foram completamente abolidas da placa de cultura (Figuras 10B e 10D).



**Figura 10:** Atividade antiproliferativa de DMT e TRY em melanomas. (a; b) Painel mostrando a atividade anticlonogênica de DMT e TRY em melanomas humanos SK-Mel-19 e SK-Mel-147 com concentrações de 100  $\mu\text{M}$  dos compostos. (c; d) Representação gráfica do número de colônias e área das mesmas quando as células são tratadas com concentrações crescentes de KYN, DMT e TRY. (\*)  $P < 0.05$ ; (\*\*)  $P < 0.01$ ; (\*\*\*)  $P < 0.001$ .

A DMT (100  $\mu\text{M}$ ) reduziu a área das colônias na SK-MEL-147, porém foi muito mais eficiente contra a SK-Mel-19, o que nos leva a pensar que a capacidade das células SK-Mel-19 em metabolizar DMT a TRY poderia ser uma explicação para o efeito antiproliferativo mais pronunciado na linhagem. De fato, a concentração de TRY é

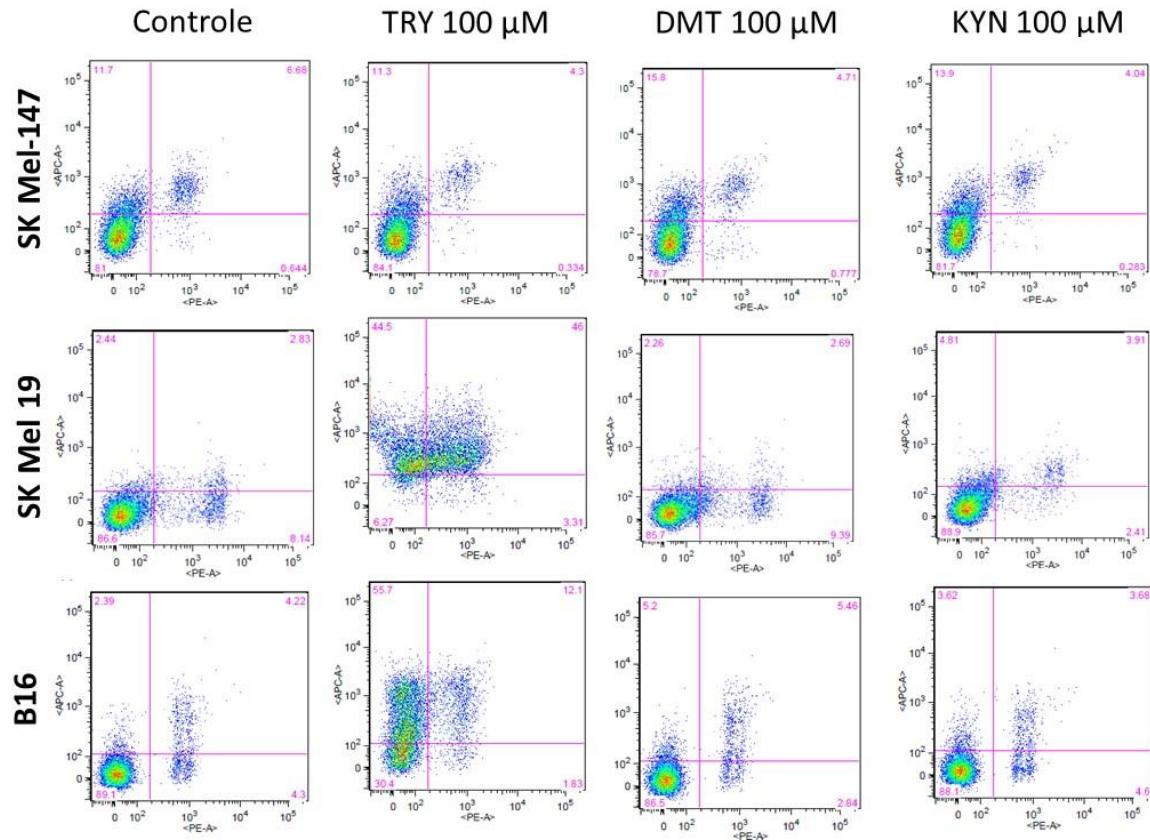
muito mais elevada na célula SK-Mel-19 do que na SK-Mel-147 após 24 h de tratamento com DMT (100  $\mu$ M) (Figura 11). Uma hipótese do grupo é de que TRY sintetizada poderia contribuir para a atividade antiproliferativa observada. Um comportamento diferente foi observado nestas linhagens em ensaios clonogênicos realizados com melatonina, neste caso, as células SK-Mel-147 foram mais sensíveis que a SK-Mel-19<sup>69</sup>, evidenciando que diferentes metabólitos do Trp podem atuar de maneira distinta dependendo da linhagem celular. Apesar do efeito proliferativo de KYN em glioblastomas<sup>55</sup>, nas condições do nosso estudo o composto aumentou apenas a área das colônias na célula SK-Mel-19 (Figura 10D).



**Figura 11:** Produção de triptamina pelos melanomas SK-Mel-147 e SK-Mel-19 após incubação por 24 h com 100  $\mu$ M de DMT. (\*) P <0,05; (\*\*) P <0,01; (\*\*\*) P <0,001.

#### *4.2.2.2. Morte celular*

A fim de identificar os mecanismos de morte celular associados aos tratamentos, as células foram marcadas com anexina e iodeto de propídeo. Observamos que a linhagem SK-Mel-147 não é afetada na presença dos compostos em estudo, entretanto, os melanomas SK-Mel-19 e B16, foram bastante sensíveis a TRY. Aparentemente, o mecanismo de morte celular induzido pelo composto é a apoptose, que pode ser observada especialmente na linhagem murina B16 (Figura 12). Outros derivados de triptamina, como por exemplo a MLT, já são conhecidos por induzir apoptose em algumas linhagens tumorais e este efeito pôde ser correlacionado com a redução da proliferação celular na linhagem de adenocarcinoma gástrico SGC7901<sup>74</sup>. O mesmo mecanismo poderia explicar os resultados obtidos em nosso ensaio clonogênico.

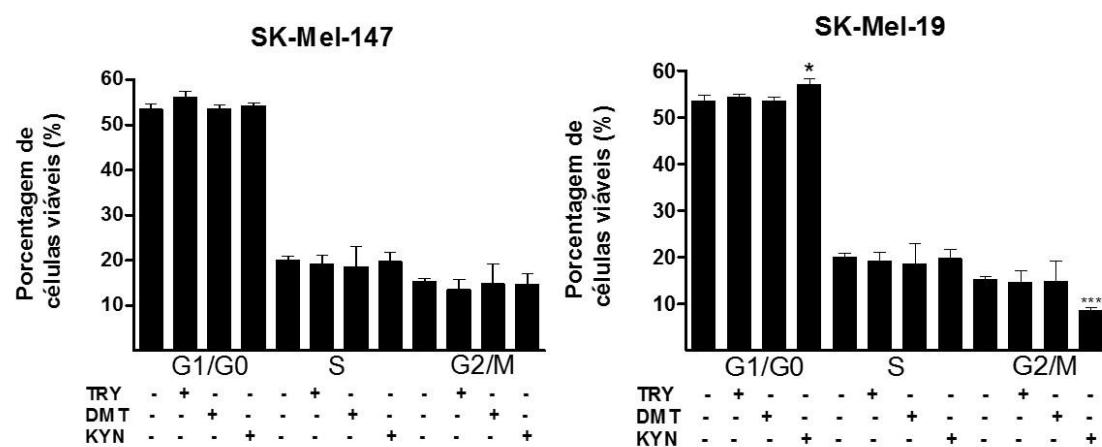


**Figura 12:** Análise da morte celular de melanomas realizada por citometria de fluxo. As células foram tratados com TRY, DMT ou KYN na concentração de 100  $\mu\text{M}$  por 48h e marcadas com anexina e iodeto de propídeo.

#### 4.2.2.3. Ciclo celular

Como TRY e DMT apresentaram uma atividade clonogênica considerável, analisamos o ciclo celular das linhagens estudadas a fim de verificar se os compostos produzem alguma modificação no funcionamento normal das células. KYN também foi considerada no ensaio. Não houve mudança significativa no ciclo com os tratamentos TRY e DMT, porém KYN aumentou levemente a fase G0/G1 e reduziu a fase G2/M do

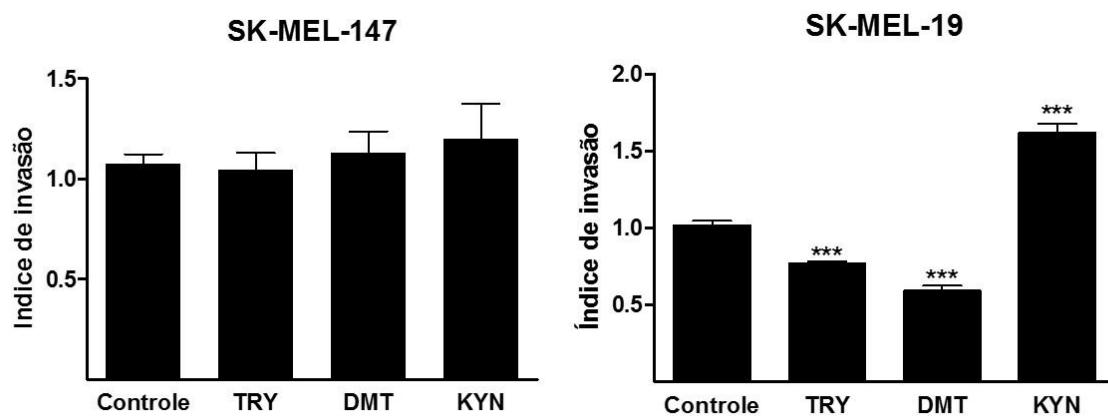
ciclo celular para a linhagem SK-Mel-19 (Figura 13). Um estudo conduzido por Mailankot et al (2008) <sup>75</sup>, descreveu alterações no ciclo de células epiteliais da lente causadas por KYN, diferentemente do que foi observado em nossos resultados, o composto proporcionou um aumento das células na fase G2/M do ciclo, mediado via IDO, uma vez que o tratamento com 1-MT inibiu a parada de ciclo.



**Figura 13:** Ciclo celular de melanomas. As células foram tratados com TRY (10 µM); DMT (50 µM) ou KYN (50 µM) por 48 h e marcadas com iodeto de propídeo. A análise foi realizada por citometria de fluxo. (\*)  $P < 0.05$ ; (\*\*)  $P < 0.01$ ; (\*\*\*)  $P < 0.001$ .

#### 4.2.2.4. Ensaio de invasão celular

Estudamos ainda se os compostos TRY, DMT e KYN podem afetar a invasão das células tumorais (Figura 14).



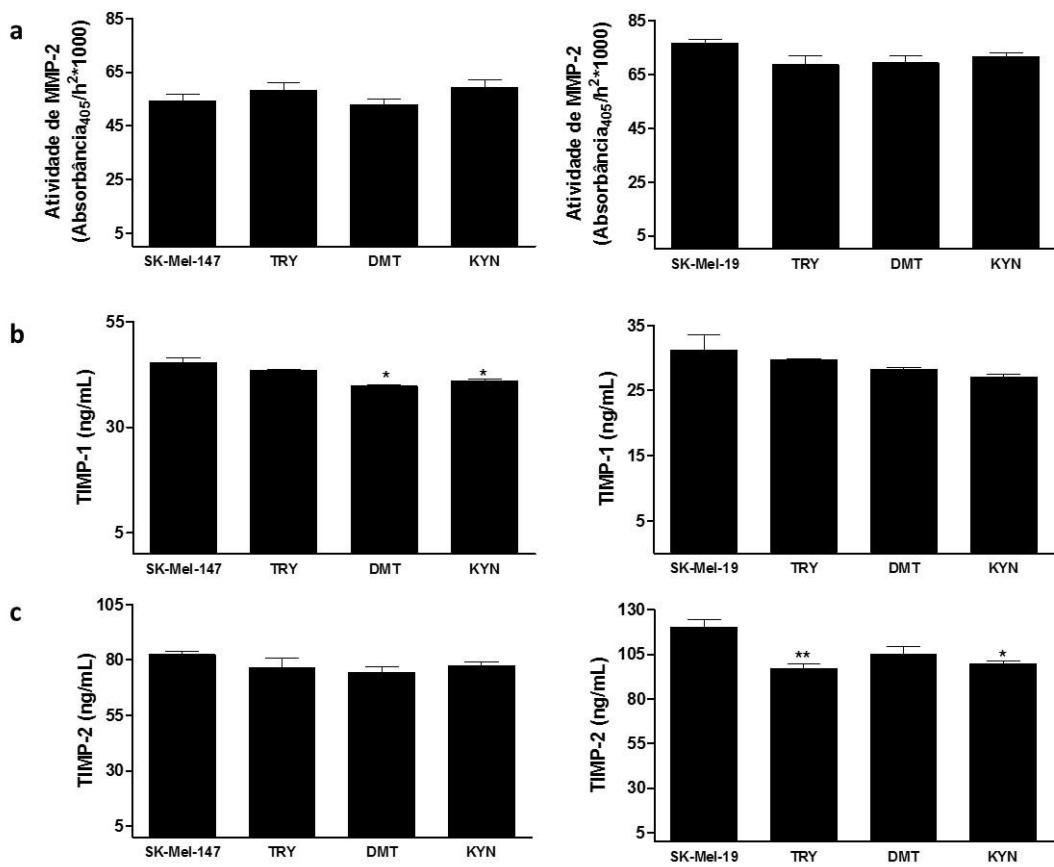
**Figura 14:** Ensaio de invasão celular de melanomas humanos SK-Mel-147 e SK-Mel-19 incubados com TRY (10 µM); DMT ou KYN (50 µM) por 48 h. (\*)  $P < 0.05$ ; (\*\*)  $P < 0.01$ ; (\*\*\*\*)  $P < 0.001$ .

Para a linhagem SK-Mel-147, não houve diferença no índice de invasão das células tratadas se comparada ao controle. Já para as células SK-Mel-19, TRY e DMT diminuíram significativamente a invasão das células enquanto que KYN aumentou o índice de invasividade (Figura 14). Até o momento nada foi relatado na literatura sobre invasão e metabólitos da via das triptaminas. Já a KYN está correlacionada com o aumento de proliferação de gliomas<sup>55</sup>, porém nada é descrito em relação a invasão. Sabe-se que a melatonina previne a motilidade e a invasividade da linhagem HepG2, um hepatocarcinoma humano, devido a inibição de metaloproteinases de matriz<sup>76</sup>. Uma

possibilidade é de que TRY, DMT e KYN possam alterar a invasão das células por este mecanismo.

#### *4.2.2.5. Determinação da atividade das metaloproteinases de matriz 2 e da concentração dos inibidores teciduais de MMPs 1 e 2*

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de endopeptidases dependentes de zinco que apresentam atividade proteolítica. Elas são importantes nos processos de migração e invasão por degradarem componentes da matriz extracelular e regularem as interações célula-célula e célula-matriz<sup>77</sup>. A atividade proteolítica das MMPs é regulada por inibidores endógenos conhecidos como inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Eles se ligam ao domínio catalítico das MMPs, inibindo-as<sup>78</sup>. Determinamos o efeito de TRY, DMT e KYN na atividade de MMP-2, uma gelatinase importante na progressão de melanoma<sup>79</sup> e observamos que os metabólitos não alteraram a atividade desta metaloproteinase (Figura 15a). Além disso, estudamos também o efeito dos metabólitos na concentração de TIMP-1 e TIMP-2 e verificamos que DMT e KYN reduziram sutilmente a concentração de TIPMP-1 na célula SK-Mel-147. O mesmo efeito foi observado em TIMP-2 quando as células SK-Mel-19 foram tratadas com TRY e KYN (Figura 15b).



**Figura 15:** Atividade de MMP-2 (a) e TIMPs 1 e 2 (b;c) nas linhagens de melanomas humanos SK-Mel-147 e SK-Mel-19 incubados com TRY (10  $\mu$ M); DMT ou KYN (50  $\mu$ M) por 48 h. (\*)  $P < 0.05$ ; (\*\*)  $P < 0.01$ ; (\*\*\*)  $P < 0.001$ .

Assim, concluímos que a redução e/ou aumento na invasão dos melanomas não está envolvido com a atividade de MMP-2. No entanto, não descartamos o envolvimento de outras MMPs não analisadas. Já a redução na concentração dos TIMPs poderia explicar parcialmente o aumento de invasão observado nas células SK-Mel-19 tratadas com KYN, porém outros mecanismos devem estar associados a redução de invasão por parte de TRY e DMT.

---

*5. CAPÍTULO II*

*EFEITOS IMUNOMEDIADOS DA VIA DAS TRITPTAMINAS EM MELANOMAS*

## **EFEITOS IMUNOMEDIADOS DA VIA DAS TRITPTAMINAS EM MELANOMAS**

A necessidade de se estudar sistemas onde há interação entre a célula tumoral e outros tipos celulares é importante devido a influência que o microambiente exerce sobre o tumor. No capítulo anterior mostramos os efeitos diretos de TRY e DMT em células de melanoma, neste, nosso objetivo foi o de verificar o papel desses metabólitos na interação entre tumor e sistema imune. Para isso, realizamos ensaios de co-cultura entre linhagens de melanoma e células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de doadores saudáveis.

### **5.1. Materiais e Métodos**

#### *5.1.1. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)*

Aproximadamente 60 mL de sangue periférico de jovens sadios foi coletado em tubos *Vacutainer* (367874, BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) contendo heparina. Após a coleta, o sangue foi separado em alíquotas de 20 mL em tubos já contendo 10 mL de tampão fosfato estéril (pH 7,4) pré-aquecido à 37 °C. A separação das células foi realizada por gradiente de densidade Ficoll-Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). A solução de sangue (30 mL) foi adicionada lentamente a tubos de fundo cônico contendo 15 mL de Ficoll-Histopaque previamente aquecidos a 37°C. Os tubos

foram centrifugados por 30 min, a 18 °C a 900 x g (aceleração 6, desaceleração 2). Após separação, as células mononucleares foram lavadas em tubo cônico com meio de cultura RPMI sem soro fetal bovino e submetidas a centrifugação a 400 x g por 10 min. Após a lavagem com meio de cultura, 20 mL de tampão hemolítico gelado (0,83% NH4Cl, 0,04% de EDTA e 0,1% NaHCO3) foram adicionados às células, que foram centrifugadas novamente. O *pellet* contendo as células mononucleares foi ressuspenso em RPMI 10% SFB no momento do uso.

#### *5.1.2. Ensaios de co-cultura*

As linhagens de melanoma SK-Mel-147 ( $2 \times 10^3$  células/poço) e SK-Mel-19 ( $5 \times 10^3$  células/poço) foram semeadas em meio RPMI com 10% SFB em placas de 96 poços com fundo em “U” e a placa foi centrifugada por 2 minutos à 2500 rpm para formação do um *pellet* de células no fundo. Após 24 horas, trocou-se o meio das células para RPMI com 3% SFB e os PBMCs, obtidos conforme descrito no item 5.1.1, foram adicionados às células tumorais na proporção de 1:50 (Tumor: PBMC). Os tratamentos TRY (10 µM), DMT (50 µM), IAA (20 µM) ou KYN (50 µM) foram adicionados e as co-culturas foram cultivadas por 72 horas em estufa a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 72 horas, os PBMCs foram retirados e as células tumorais foram destacadas da placa utilizando tripsina e foram contadas utilizando câmara de Neubauer e o corante azul de Trypan.

### *5.1.3. Extração de metabólitos do Trp das co-culturas*

Para análise dos metabólitos do Trp na condição de co-cultura foi necessário adaptar a metodologia descrita anteriormente. Para tanto, as linhagens SK-Mel-147 ( $3 \times 10^4$  células/poço) e SK-Mel-19 ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram semeadas em placas de 12 poços. Após 24 horas os PBMC foram adicionados às células tumorais na proporção de 1:50 (Tumor: PBMC). Os tratamentos TRY (10  $\mu\text{M}$ ), DMT (50  $\mu\text{M}$ ), IAA (20  $\mu\text{M}$ ) ou KYN (50  $\mu\text{M}$ ) foram adicionados e as co-culturas foram cultivadas por 48 horas em estufa a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 48 horas, o sobrenadante foi retirado e 500  $\mu\text{L}$  foram utilizados para análise dos metabólitos do Trp conforme método descrito no capítulo I, item 4.1.4. O restante do sobrenadante foi utilizado para dosagem de citocinas imunomodulatórias.

### *5.1.4. Determinação de citocinas pelo método de ELISA*

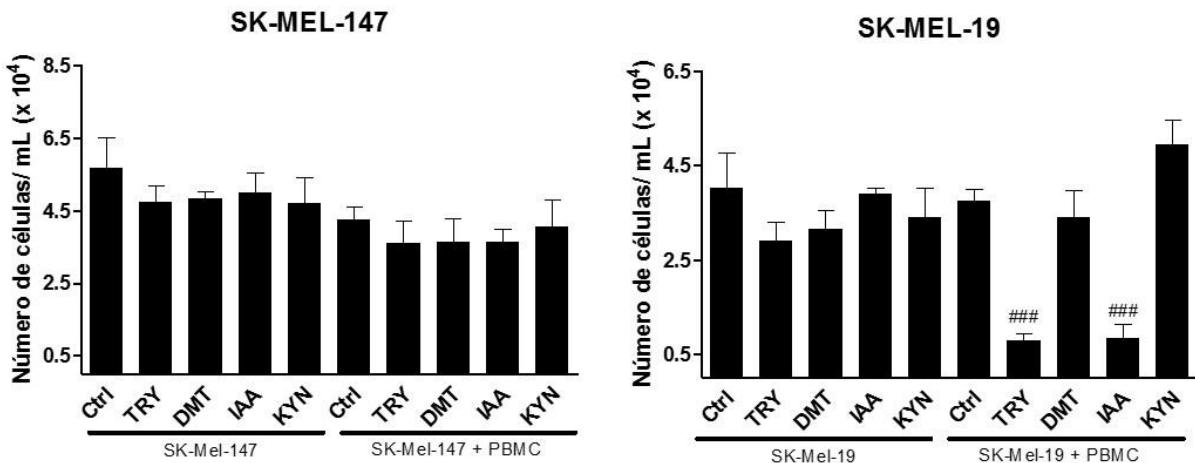
Para este experimento foi utilizado o sobrenadante das co-culturas utilizadas para análise de metabolitos do Trp, conforme descrito no item 5.1.3. As citocinas IL-8, TNF- $\alpha$  e IFN foram determinadas pelo método de ELISA, em placas montadas e padronizadas a partir do DuoSet da R&D Systems.

## **5.2. Resultados e Discussão**

### *5.2.1. Análise da citotoxicidade de TRY, DMT, IAA e KYN em co-culturas de melanomas*

Em um trabalho anterior, nosso grupo de pesquisa demonstrou que TRY e DMT foram capazes de aumentar a citotoxicidade de PBMCs contra uma linhagem tumoral de glioma humano (A172)<sup>5</sup>. Com intuído de verificar se o mesmo efeito era observado em melanomas realizamos um experimento de co-cultura (célula tumoral + PBMCs) e incubamos as células com TRY, DMT, IAA ou KYN. IAA foi avaliado por ser um metabólito produzido tanto pela degradação de TRY quanto DMT, além de ser um metabólito comum a outras vias de degradação Trp.

A co-cultura foi padronizada na proporção de 1:50 (célula tumoral: PBMC) e foi cultivada em placas de 96 poços em formato de “U”, durante 72 horas, estas placas foram utilizadas para que a maior parte das células tumorais estivessem em contato com as células imunes. Nas condições deste estudo nenhum dos tratamentos afetou diretamente o crescimento das células SK-Mel-147. Porém, para as células SK-Mel-19 foi possível observar uma redução significativa na contagem de células tumorais quando foram adicionados PBMCs com TRY ou IAA, isto é, estes metabólitos ativaram a resposta antitumoral dos PBMCs (Figura 16).



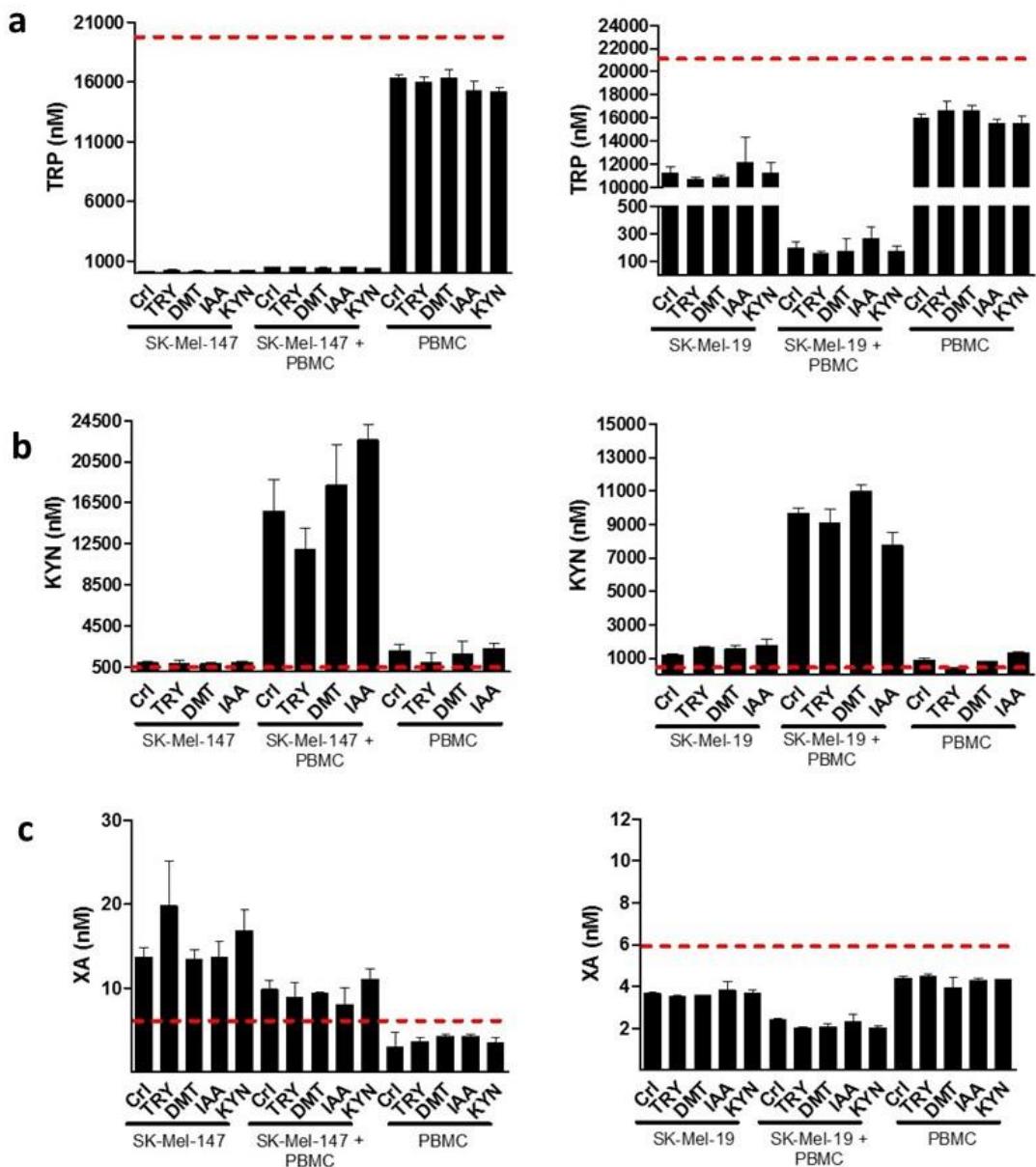
**Figura 16:** Contagem do número de células de melanoma viáveis, após serem co-cultivadas com PBMC por 72 horas, com ou sem estímulo de TRY (10 µM), DMT (50 µM), IAA (20 µM) ou KYN (50 µM). (\*)  $P < 0.05$ ; (\*\*)  $P < 0.01$ ; (\*\*\*)  $P < 0.001$ .

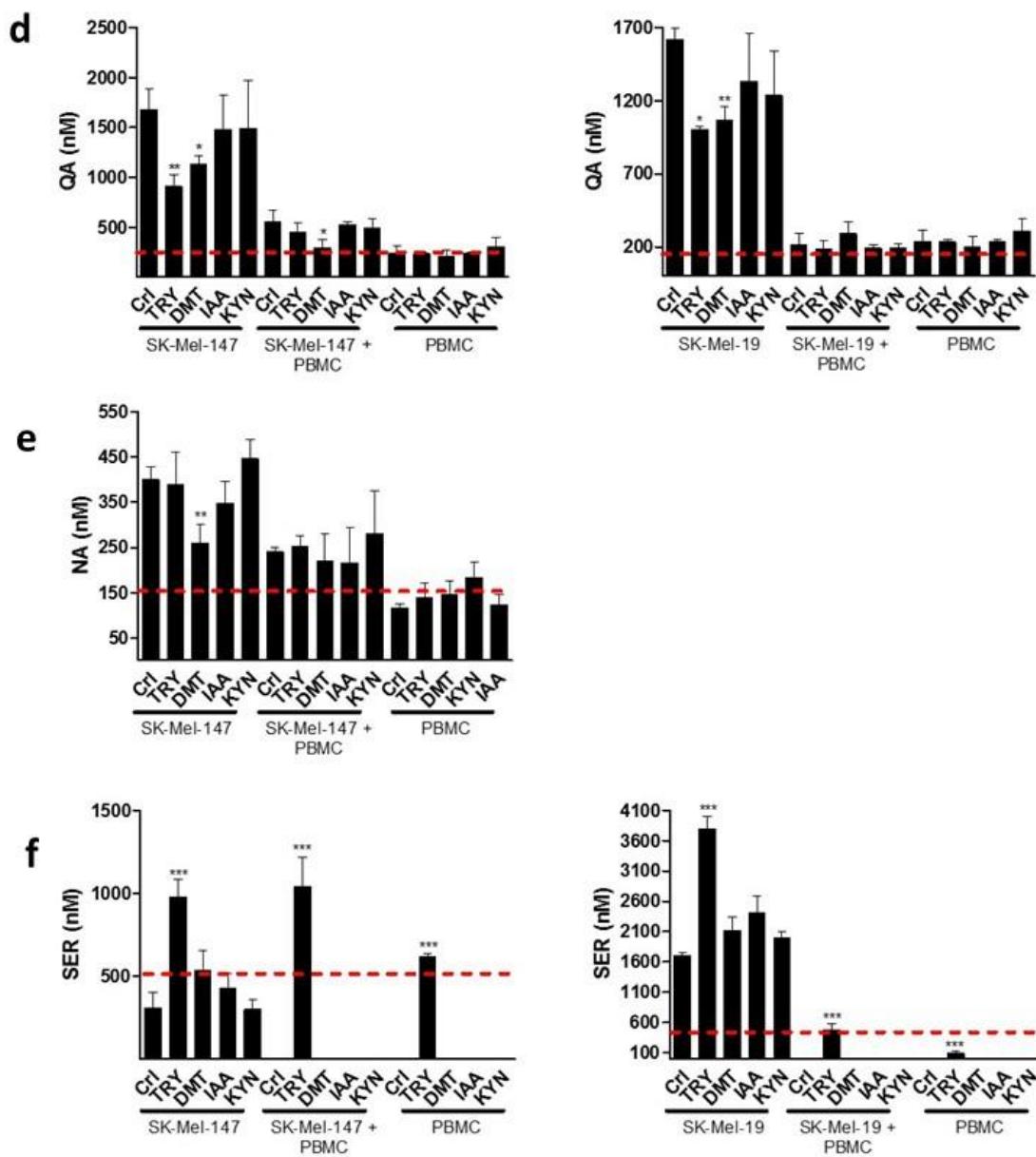
Assim, percebemos que metabólitos da via das triptaminas podem atuar diretamente no combate as células tumorais e/ou auxiliar o sistema imune. Apesar de DMT não contribuir com a citotoxicidade de PBMCs em melanomas, estes dados reforçam o resultado do nosso grupo em relação a TRY, que manteve o mesmo efeito tanto em gliomas quanto em melanomas. Além disso, revela uma novidade ao mostrar que IAA também pode auxiliar o sistema imune no combate as células tumorais de melanoma.

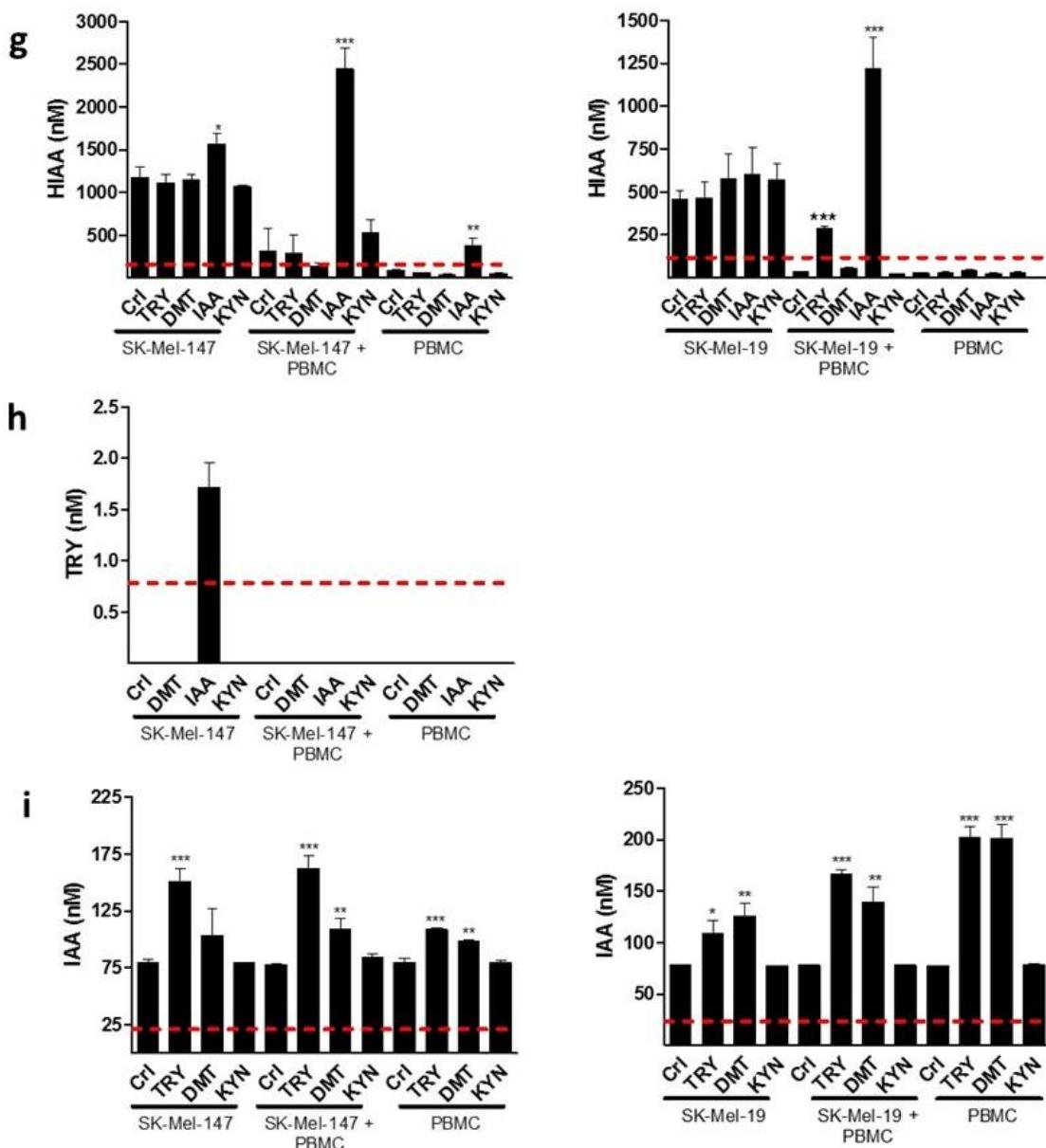
### 5.2.2. Metabólitos do Trp em co-culturas de melanoma

Realizamos ensaios de metabolismo nas co-culturas a fim de verificar o comportamento das três rotas de degradação do Trp e entender se possíveis diferenças

metabólicas poderiam explicar a citotoxicidade dos compostos TRY e IAA na condição de co-cultura.





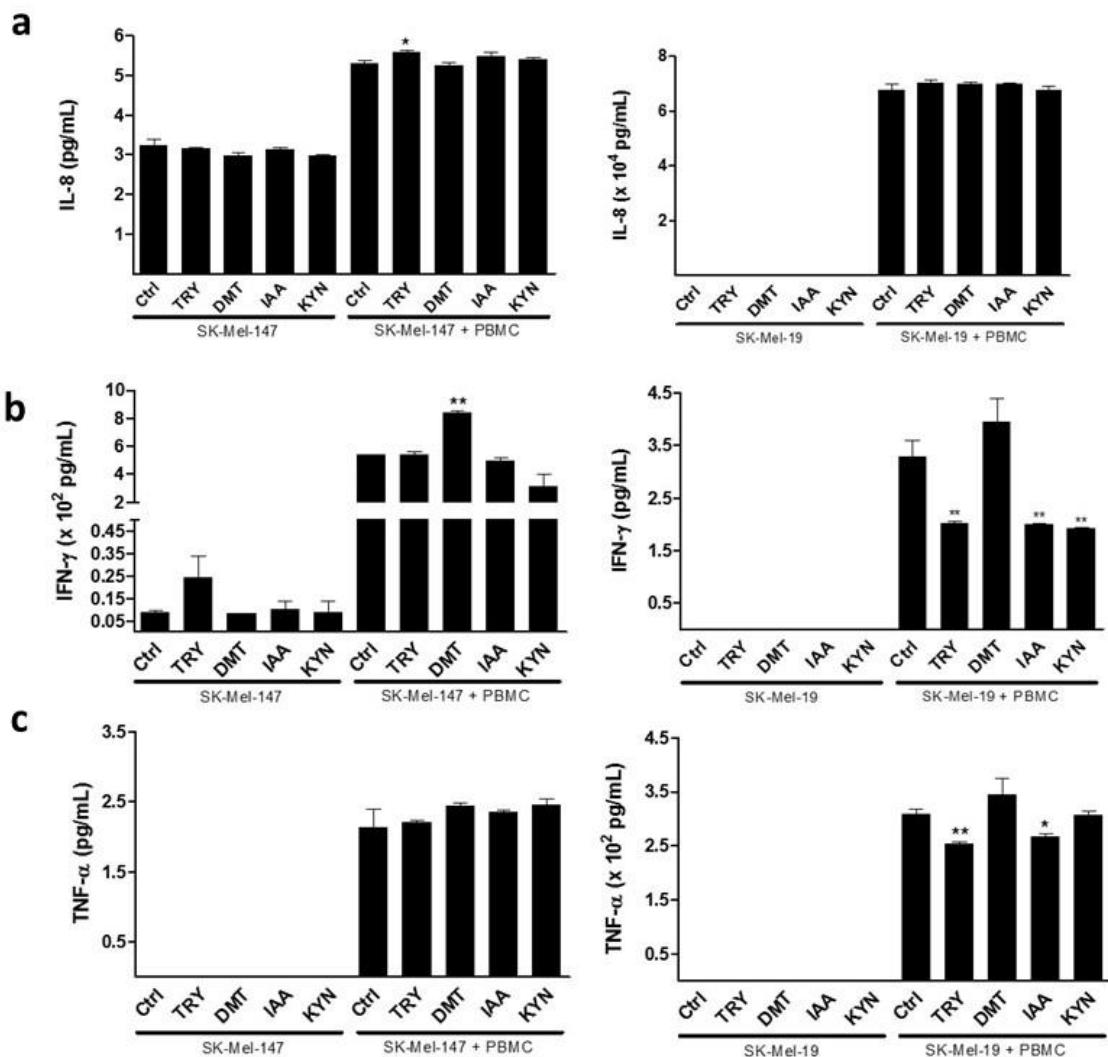


**Figura 17:** Efeito da adição de TRY (10  $\mu$ M), DMT (50  $\mu$ M), IAA (20  $\mu$ M) ou KYN (50  $\mu$ M) em melanomas SK-Mel-147 e SK-Mel-19 isolados, em co-cultura e em PBMCs isolados. As células foram tratadas e incubadas por 48 h com os esfímulos. (\*) P <0,05; (\*\*) P <0,01; (\*\*\*) P <0,001.

Como pode ser observado nos gráficos, a via das quinureninas é pouco afetada com a adição dos metabólitos. Existe a diminuição de QA nas células SK-Mel-147 e SK-Mel-19 tratadas com TRY ou DMT, principalmente quando as células não estão em co-cultura (Figura 17d), corroborando com os dados apresentados no capítulo anterior. Existe também uma diminuição na produção de NA nas células SK-Mel-147 (Figura 17e). Já na via serotoninérgica, TRY aumenta a produção de SER (Figura 17f), fato observado tanto na condição de co-cultura como nas células isoladas. Dados da literatura mostram que medicamentos antidepressivos inibidores da recaptação de SER como sertralina e fluoxetina inibem o crescimento tumoral, inclusive em melanomas<sup>80;81</sup>. Como estes medicamentos aumentam a concentração de SER, uma hipótese é de que este efeito seja decorrente deste neurotransmissor. Assim, uma possibilidade é que a SER sintetizada quando adicionamos TRY no meio de cultura possa estar contribuindo para a atividade antitumoral dos compostos, mas ensaios precisam ser realizados para verificar este fato. Por fim, na via das triptaminas, a presença de IAA aumenta a concentração do metabólito da via serotoninérgica HIAA (Figura 17g) e TRY aumenta a concentração de IAA (Figura 17i), fato que pode ser explicado devido a via normal de metabolização destes compostos.

### *5.2.3. Produção de citocinas*

Leucócitos infiltrados no tecido tumoral produzem citocinas, fatores de crescimento e angiogênicos assim como proteases que degradam a matriz extracelular e, desta forma, células e mediadores inflamatórios estão envolvidos na migração, invasão e metástases de células malignas<sup>82</sup>. Estima-se que aproximadamente 20% dos cânceres iniciam a partir de infecções ou inflamações crônicas e, mesmo os que não se desenvolvem a partir desses fatores, apresentam infiltrado inflamatório no microambiente tumoral, com grande concentração de citocinas<sup>83</sup>. Além disso, sabe-se que a síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias durante processos inflamatórios estão relacionadas à malignidade<sup>82</sup>. Assim, verificamos o efeito de TRY, DMT, IAA e KYN na produção de IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  por serem citocinas importantes no microambiente do melanoma (Figura 18).



**Figura 18:** Efeito da adição de TRY (10 µM), DMT (50 µM), IAA (20 µM) ou KYN (50 µM) na produção de citocinas em melanomas SK-Mel-147 e SK-Mel-19 isolados e em co-cultura. As células foram tratadas e incubadas por 48 h com os esfímulos. (\*) P <0,05; (\*\*) P <0,01; (\*\*\*) P <0,001

A produção de IL-8 quase não é modificada com a adição dos metabólitos. Um fato interessante é que a célula SK-Mel-147 produz esta citocina em grande quantidade

no estado basal, já para a linhagem SK-Mel-19 não conseguimos detectar a presença de IL-8 sem a adição de PBMCs (Figura 18a). Esta citocina é um importante fator quimiotático para neutrófilos em condições normais, porém, estudos demonstram que a secreção de IL-8 por diversas linhagens de melanoma está relacionada com a proliferação tumoral<sup>84</sup>. De fato, *in vitro* a linhagem SK-Mel-147 cresce bem mais rapidamente que a SK-Mel-19. Já o TNF- $\alpha$  em nossas condições de análise somente foi detectado na presença de PBMCs em ambas as células e não houve diferença significativa na secreção com os tratamentos realizados na linhagem SK-Mel-147, no entanto, TRY e IAA reduziram a secreção desta citocina na célula SK-Mel-19 (Figura 18b). TNF- $\alpha$  está amplamente correlacionado com a habilidade de invasão de melanomas, sendo assim, estes metabólitos poderiam reduzir a invasividade quando presentes no microambiente tumoral. Além disso, o que chama a atenção é o fato de estes mesmos metabólitos aumentarem a citotoxicidade dos PBMCs nesta linhagem, indicando que a redução de TNF- $\alpha$  poderia estar envolvida no processo.

Por fim, avaliamos a produção de IFN, este é responsável por induzir a expressão de IDO em células tumorais e consequentemente a secreção de KYN, levando ao imune escape. Percebemos que IFN é secretado apenas pela linhagem SK-Mel-147 em nossas condições de ensaio e a produção é pouco afetada na presença dos tratamentos, porém DMT aumentou a produção da citocina na condição de co-cultura (Figura 18c). O aumento de IFN por DMT já foi demonstrado na literatura, onde células

NK foram tratadas com a substância <sup>2</sup>. Para as células SK-Mel-19, observamos que TRY, IAA e KYN reduzem a secreção da citocina, como IFN induz a secreção de KYN; TRY e IAA poderiam auxiliar os PBMCs no combate as células tumorais por este mecanismo. Além disso, a redução de IFN quando as células são tratadas com KYN pode indicar um *feedback* negativo na própria via de metabolização.

---

*6. CAPÍTULO III*

*ESTUDO DO RECEPTOR DE ARIL HIDROCARBONETOS*

## ***ESTUDO DO RECEPTOR DE ARIL HIDROCARBONETOS***

Este último capítulo é dedicado ao estudo do receptor de aril hidrocarbonetos e sua relação com os metabólitos do TRP. Como já mencionado o receptor está amplamente envolvido com os processos de proliferação, invasão e progressão de diversos tipos de tumor, inclusive de melanomas. Assim, pretendemos avaliar se os efeitos biológicos descritos para os metabólitos da via das triptaminas está associado a ligação destes no receptor AHR. E ainda, determinar se DMT é um possível ligante do receptor, uma vez que já foi demonstrado na literatura que alguns metabolitos do Trp são possíveis ligantes endógenos do receptor<sup>51</sup>.

### **6.1. Materiais e Métodos**

#### *6.1.1. Cultivo celular*

Para este capítulo, além das linhagens de melanoma SK-Mel-147 e SK-Mel-19, também foram utilizadas a linhagem de glioma humano T98G e a linhagem de hepatoma murino Hepa1c1c7<sup>55,85</sup>. Estas duas linhagens foram utilizadas como controle nos experimentos uma vez que são descritas na literatura como células que sabidamente possuem uma alta expressão do receptor de aril hidrocarbonetos.

Os gliomas foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Silvya Stuchi Maria-Engler (FCF-USP) e a linhagem de hepatoma murino foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Ambas foram cultivadas em meio *Dulbecco's modified Eagle's médium* (DMEM) alta glicose (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (FBS, Sigma), 50 U/ ml de penicilina e 50 mg/mL de estreptomicina (Invitrogen) e mantidas em estufa a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 6.1.2. Expressão de AHR e CYP1A1

A extração do RNA total das células foi realizada pelo Kit Rneasy (Qiagen), de acordo com protocolo recomendado pelo fornecedor. O RNA extraído foi quantificado por NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) a 260 nm e sua pureza avaliada em comprimento de onda de 260/280 nm. A síntese da fita de DNA complementar foi realizada pelo kit *SuperScript™ First-Strand synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. As células foram avaliadas quanto a expressão de AHR e CYP1A1 por PCR em tempo real pelo sistema TaqMan. Os iniciadores e sondas utilizados são inventariados pela empresa Invitrogen. A expressão relativa dos genes foi calculada pelo método matemático de 2<sup>-ΔΔCT</sup>.

#### *6.1.3. Atividade do CYP1A1*

Para determinar a atividade do CYP1A1 as células SK-Mel-147 e SK-Mel-19 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 12 h ou 24 h com TRY; DMT; KYN (100  $\mu$ M) ou TCDD (10 nM). Após o tempo de incubação as células foram lavadas com PBS e 100  $\mu$ L/poço de meio de cultura contendo 8  $\mu$ M de etoxiresorufina (EROD) e 10  $\mu$ M de dicumarol foi adicionado. Logo após, incubamos a placa por 30 min. Passado o período de incubação, 75  $\mu$ L do meio de cultura foi transferido para outra placa e 15 U de  $\beta$ -glicuronidase e 120 U de arilsulfatase em 25  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,5 foram adicionados. Incubamos a nova placa por 2 h a 37° sob agitação e após este período, 200  $\mu$ L de etanol foram adicionados em cada poço e a placa centrifugada a 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi diluído 10 vezes e a fluorescência medida ( $\lambda_{exc.} = 530$  nm,  $\lambda_{em.} = 590$  nm). A atividade foi determinada com base em uma curva de calibração realizada com resorufina, produto final da reação.

#### *6.1.4. Imunofluorescência*

Para estudar o efeito de TRY, DMT e KYN na translocação do receptor AHR, as células foram cultivadas e tratadas com os metabólitos (100  $\mu$ M) em lâminas e fixadas com formaldeído 4% por 10 min. Para o controle positivo, utilizamos o composto TCDD na concentração de 10 nM. Logo após a fixação, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS e a etapa de bloqueio foi realizada com uma solução contendo 10% de soro de cabra, 1% de albumina sérica bovina (BSA) e 0,3 M de glicina diluídos em PBS

contendo tween 0,1%. O bloqueio foi realizado por 2 h. Para a marcação do receptor AHR (verde), foi utilizado o anticorpo monoclonal do receptor de aril hidrocarbonetos (Abcam 2769) na proporção 1:200, diluído em tampão PBS contendo tween 0,1% + 1% de BSA, e as lâminas foram incubadas por 12h a 4°C. Após o período de incubação, foram feitas três lavagens (5 min cada) com PBS contendo tween 0,1% e foi adicionado o anticorpo secundário AlexaFluor 488 goat anti-mouse Ig-G (1:1000 em PBS), que ficou em contato com as células por 1 h. Procedeu-se então mais três lavagens (5 min cada) realizadas com PBS contendo tween 0,1%. O citoplasma (vermelho) das células foi marcado com rodamina-faloidina (1:20) diluídos em PBS tween 0,1% + 1 % de BSA por 20 min. Após mais três lavagens, coramos o núcleo (azul) com DAPI por 1 min e as marcações foram observadas no microscópio de fluorescência.

#### *6.1.5. Ensaio clonogênico*

O ensaio clonogênico foi realizado com as células SK-Mel-147, SK-Mel-19, T98G e Hepa1c1c7. Antes do tratamento, 300 células foram semeadas em placas de 6 poços e cultivadas durante 24 h. As células foram expostas a TRY (100 µM); DMT (100 µM); KYN (100 µM); TCDD (10 nM); CH223191 (1µM); TRY (100 µM) + CH223191 (1 µM); DMT (100 µM) + CH223191 (1 µM); KYN (100 µM) + CH223191 (1 µM) ou TCDD (10 nM) + CH223191 (1 µM). O meio de cultura contendo os tratamentos foi substituído a cada 48 h. As células foram cultivadas por 15 dias até a

formação de colônias. No 15º dia, as culturas foram fixadas com glutaraldeído (6,0% v/v) e coradas com violeta de cristal (0,5% g/v).

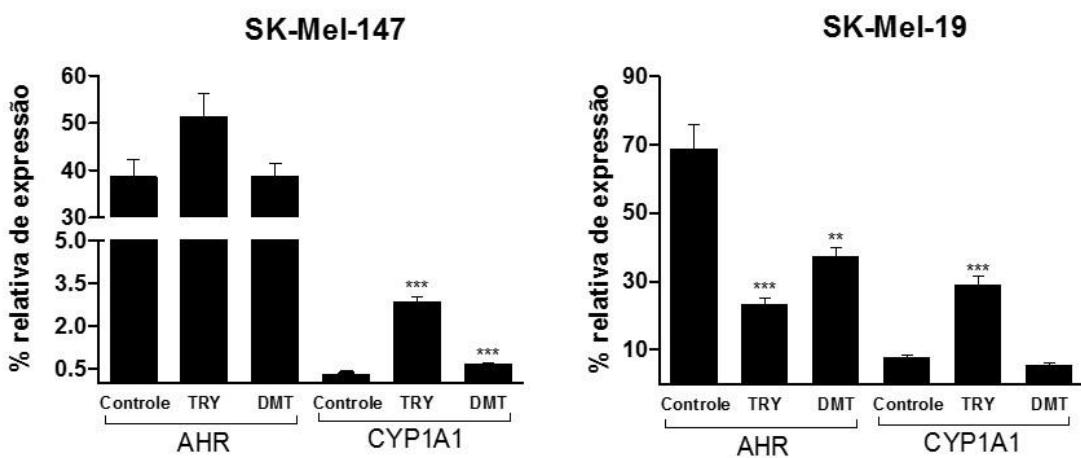
## **6.2.Resultados e Discussão**

### **6.2.1. Estudo do receptor AHR**

A diversidade de resultados obtidos no ensaio clonogênico para as linhagens SK-Mel-147 e SK-Mel-19 (Figura 10) pode estar ligada ao perfil de expressão de alguns receptores ou capacidade de ligação das moléculas TRY e DMT aos mesmos. Um receptor que vem ganhando importância em processos tumorais é o receptor de aril hidrocarbonetos (AHR). A ligação de compostos no AHR pode ser pró ou antitumoral dependendo da linhagem celular e do tipo de ligante. Em melanomas o receptor pode estar ligado a modulação da migração e invasão celular, sendo um potencial alvo terapêutico, porém os dados a respeito AHR ainda são controversos. Um estudo demonstrou que enquanto a não expressão do receptor favorece o fenótipo de transição epitelio-mesenquimal, com aumento de migração e tumorigênese; a ativação do AHR constitutivo impede o crescimento e disseminação do melanoma. Ainda, a expressão proteica de AHR é menor em melanomas humanos se comparado ao nevo, não maligno, sugerindo uma possível relação do receptor com o fenótipo tumoral<sup>86</sup>. Recentemente a leflunomida, uma droga

testada clinicamente, previamente caracterizada como agonista de AHR, foi capaz de inibir a proliferação de células de melanoma A375 de forma AHR-dependente<sup>53</sup>. Porém, estes resultados contradizem um estudo mais antigo realizado por Villano *et al* (2006), em que as linhagens de melanoma mais metastáticas expressaram uma quantidade maior de AHR<sup>87</sup>. Os mesmos autores demonstram que a via do AHR é ativa também em melanócitos humanos. Vê se por tudo isso que mais estudos a respeito do AHR são necessários.

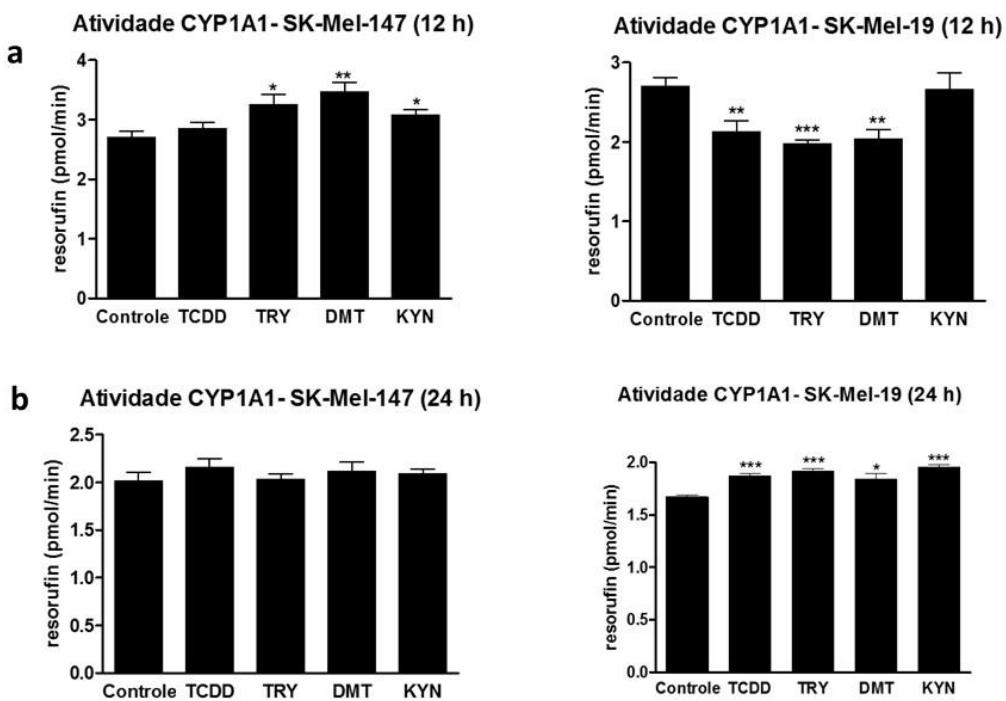
Sabendo-se que alguns metabólitos do Trp como TRY e KYN já foram reportados como possíveis ligantes endógenos do receptor<sup>51; 55</sup>, um dos objetivos deste estudo é determinar se a DMT também é um ligante do mesmo e se a atividade clonogênica observada com os tratamentos TRY e DMT poderiam estar envolvidas com o AHR. Para tal, primeiramente verificamos a expressão gênica do receptor nas linhagens de melanoma estudados. Como a ligação de compostos ativa a transcrição de vários genes, um indício de que o receptor possa estar ativado é o aumento na expressão gênica de genes alvo, como por exemplo, o CYP1A1, desta forma, também investigamos a expressão gênica do mesmo na presença de nossos tratamentos (Figura 19).



**Figura 19:** Expressão gênica do AHR e CYP1A1 na ausência de estímulo e na presença de TRY e DMT (100  $\mu$ M) por PCR em tempo real. O gene *gapdh* foi utilizado como calibrador da reação. A análise comparativa foi feita em relação a expressão do gene *idol* na linhagem SK-Mel-147. O método comparativo ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) foi utilizado para comparar os níveis de expressão de RNAm. (\*)  $P < 0.05$ ; (\*\*)  $P < 0.01$ ; (\*\*\*)  $P < 0.001$ .

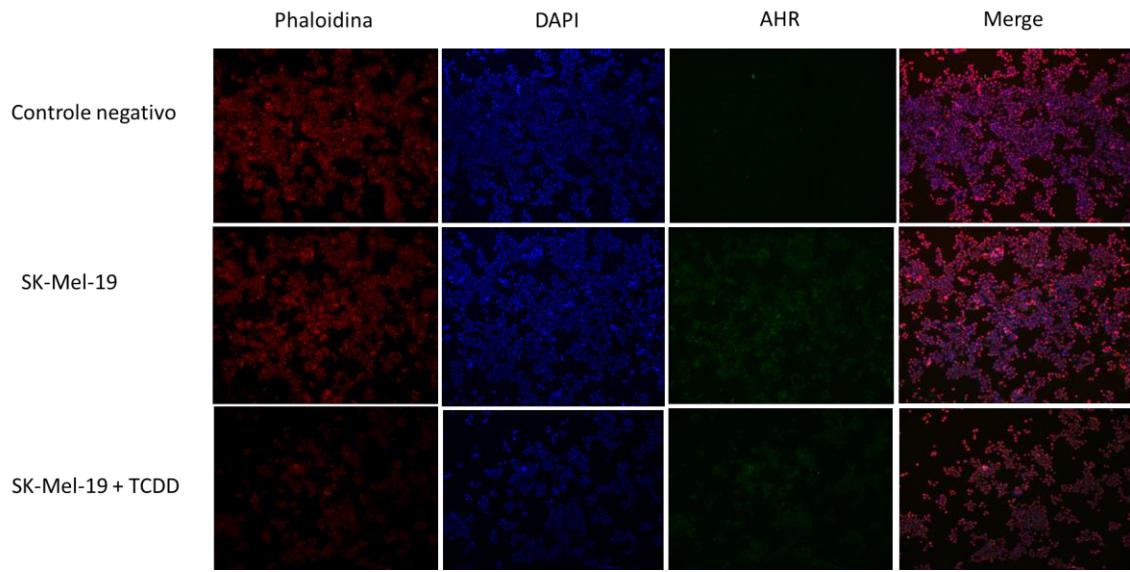
Como pode ser observado na figura 19, ambas as células expressam o receptor AHR e o gene CYP1A1. A linhagem mais responsiva no ensaio clonogênico (SK-Mel-19), apresenta uma expressão mais elevada do receptor do que a SK-Mel-147. Quando as células SK-Mel-147 são tratadas com TRY e DMT há um aumento na expressão gênica do CYP1A1, indicando uma possível ligação destes compostos no receptor AHR. Já para as células SK-Mel-19, apenas a TRY foi capaz de aumentar a expressão do gene CYP1A1, porém os tratamentos reduziram significativamente a expressão do receptor.

Como a atividade do CYP1A1 também se apresenta aumentada quando o AHR está ativado, realizamos um ensaio de atividade do CYP1A1 (Figura 20). Aqui adicionamos também o TCDD e a KYN para realizar um comparativo, já que o primeiro é o ligante clássico do receptor e pode ser usado como um controle positivo e o segundo sabidamente ativa o AHR. Aparentemente TRY, DMT e KYN aumentam a atividade do citocromo quando incubados por 12 h com as células SK-Mel-147 (Figura 20a), já para a SK-Mel-19, é necessário um tempo de incubação de 24 h com os compostos (Figura 20b). Não foi possível obter resultados conclusivos, uma vez que o TCDD (controle positivo) não aumentou significativamente a atividade do CYP1A1. Acreditamos que o tempo de incubação com TCDD tenha sido longo demais para estas células, outros tempos de incubação foram testados mas não conseguimos chegar a uma situação ideal.



**Figura 20:** Atividade do CYP1A1 em melanomas tratados e não tratados com TRY, DMT, KYN (100 µM) e TCDD (10 nM) por um período de 12 ou 24 h. O cálculo da atividade foi feito com base na produção de resorufina. (\*)  $P < 0.05$ ; (\*\*)  $P < 0.01$ ; (\*\*\*)  $P < 0.001$ .

Como os testes anteriores apenas nos fornecem indícios de uma possível ligação dos compostos no receptor, concomitantemente ensaios de imunofluorescência foram realizados para verificar a translocação do receptor do citoplasma para o núcleo das células. Não conseguimos obter resultados fidedignos pois também no ensaio de imunofluorescência não conseguimos um controle positivo adequado (Figura 21).



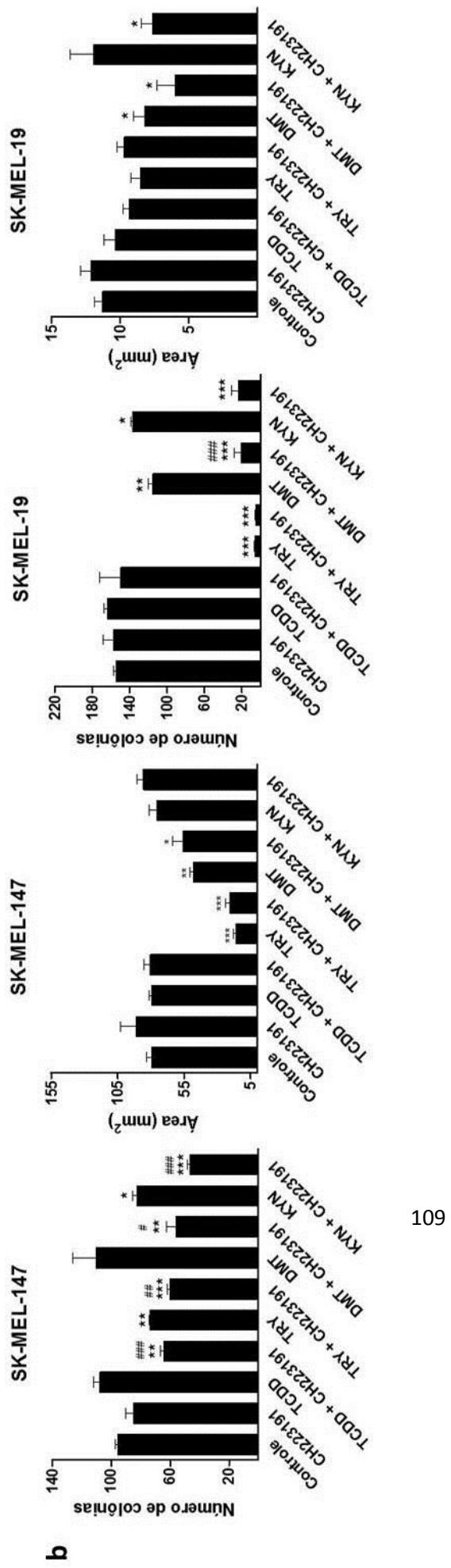
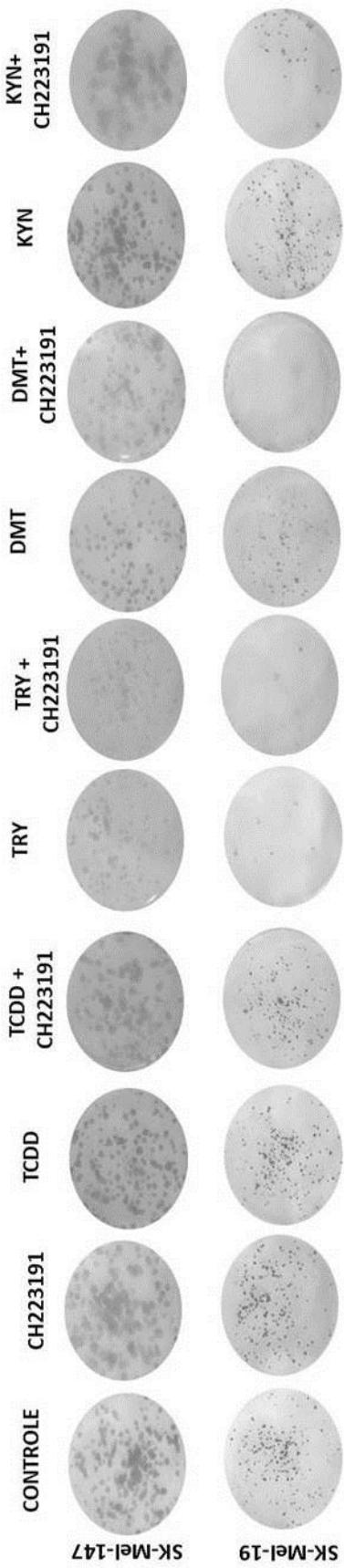
**Figura 21:** Imunofluorescência do receptor AHR. As células SK-Mel-19 foram tratadas com TCDD (10 nM) por 2 h e fixadas formaldeído 4%. O bloqueio foi realizado por 2 h. Para a marcação do receptor AHR (verde), foi utilizado o anticorpo monoclonal do receptor de aril hidrocarbonetos (Abcam 2769) na proporção 1:200. O citoplasma (vermelho) foi marcado com rodamina-faloidina (1:20) e o núcleo (azul) com DAPI. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência, no aumento de 10x

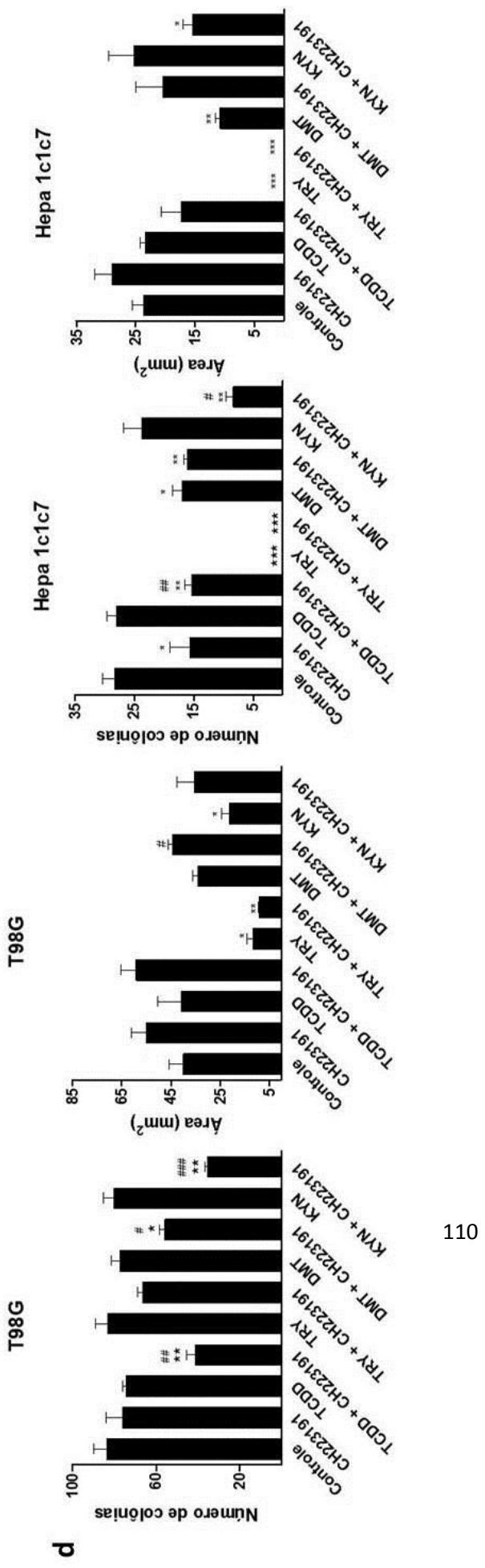
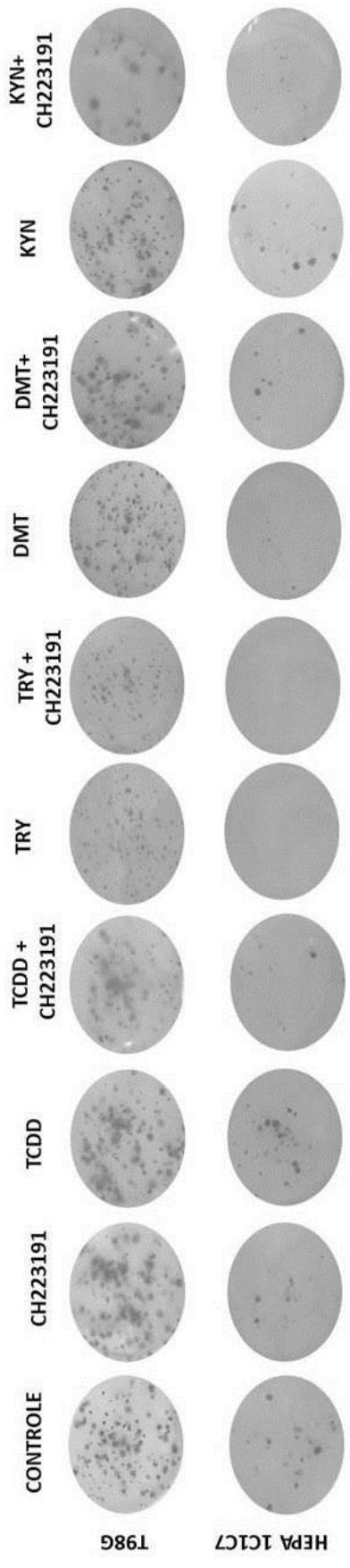
Tentamos reproduzir ensaios da literatura nas células T98G e Hepa1c1c7, a primeira sendo exposta ao 3-metilclorantreno (ativador do AHR) na concentração de 10  $\mu$ M por 20 horas e a segunda exposta ao TCDD (3 nM) por 1 hora, seguindo os experimentos descritos por Optiz et al (2011) e Kim et al (2006), respectivamente. Não obtivemos sucesso nos experimentos (dados não mostrados), sendo assim, não foi possível determinar se DMT é ou não um ligante do receptor.

No entanto, para verificar se o receptor está ligado a atividade anticonogênica de TRY e DMT, realizamos um ensaio clonogênico com os compostos TRY, DMT,

KYN, TCDD e CH223191; este último é um inibidor do receptor AHR e comparamos os resultados obtidos com clonogênicos realizados com os metabólitos acrescidos do receptor inibido (Figura 22).

Observamos que nas células SK-Mel-147 e SK-Mel-19, o número de colônias e/ou áreas das colônias não é afetado na presença do inibidor CH223191 isoladamente (Figura 22b). Além disso, houve a redução da clonogenicidade das células com os tratamentos TRY ou DMT, no entanto estes resultados não foram alterados quando as células foram tratadas com os metabólitos acrescidos de CH223191. TRY e DMT continuaram reduzindo a proliferação das células tumorais mesmo com o receptor inibido, o que nos leva a crer que o efeito não depende da ligação dos compostos no AHR para estas linhagens de melanoma (Figura 22b), o mesmo acontece com as células T98G e Hepa1c1c7 (Figura 22 c; d).





**Figura 22:** (a; c) Painel mostrando a atividade clonogênica da linhagens SK-Mel-147; SK-Mel-19; T98G e Hepa1c1c7; ( b; d) Representação gráfica do número de colônias e área das mesmas quando as células são tratadas com CH223191 (1 $\mu$ M); TCDD (10 nM); TRY (100  $\mu$ M); DMT (100  $\mu$ M); KYN (100  $\mu$ M); TCDD (10 nM) + CH223191 (1  $\mu$ M); TRY (100  $\mu$ M) + CH223191 (1  $\mu$ M); DMT (100  $\mu$ M) + CH223191 (1  $\mu$ M); KYN (100  $\mu$ M) + CH223191 (1  $\mu$ M). (\*)  $P < 0.001$ , comparação com as células controle e (#)  $P < 0.001$ , comparação tratamento x tratamentos + inibidor.

Em relação a KYN, verificamos que quando o receptor está inibido e a KYN é adicionada ao meio de cultura ocorre uma redução na proliferação das células tumorais. (Figura 22 b, d). Como já mencionado, dados da literatura demonstram que os efeitos mediados por KYN dependem da ligação no receptor, neste caso, nossos resultados corroboraram com os estudos da literatura e KYN pôde ser utilizado como um controle positivo do experimento. Este estudo nos leva a crer que apesar de metabólitos da via das quinureninas atuarem no receptor AHR, as atividades biológicas dos metabólitos da via das triptaminas são mediados por outros receptores e/ou vias de sinalização.

Embora não seja foco deste estudo, vale a pena mencionar a sinalização via receptor sigma ( $\sigma$ ). Compostos antagonistas do receptor  $\sigma$  - 1 e agonistas de receptores  $\sigma$  - 2 podem inibir a proliferação celular e induzir a apoptose, sendo alvos importantes no tratamento do câncer <sup>88</sup>. Curiosamente, TRY, exibe maior afinidade ao receptor  $\sigma$  - 2 ( $K_d = 4,31 \mu M$ ) do que ao receptor  $\sigma$  - 1 ( $K_d = 431,55 \mu M$ ) <sup>1</sup>, em contrapartida, a N, N - dimetilação da TRY diminui a afinidade ao  $\sigma$  - 2. Essas descobertas podem explicar o porquê a TRY é mais eficiente ao diminuir a formação de colônias quando comparada a DMT <sup>1; 46</sup>. Por outro lado, a DMT foi caracterizada como um agonista  $\sigma$  - 1 em concentrações micromolares ( $K_d = 14,75 \text{ mM}$ ). Estudos *in vivo* e *in vitro* têm mostrado que agonistas  $\sigma$  - 1 são capazes

de exercer efeitos neuroprotetores devido a regulação dos níveis de cálcio intracelular e expressão de pró-genes apoptóticos (como a Bcl - 2). Este mecanismo pode resultar em neuroproteção durante e após episódios de isquemia e acidose <sup>1; 89; 90</sup>. Um estudo recente demonstrou a presença da enzima INMT em motoneurônios em locais próximos ao receptor σ, indicando que a DMT poderia ativar o receptor e regular a excitabilidade dos motoneurônios, podendo estar envolvido com o sistema motor. De fato, a injeção de DMT foi capaz de aumentar a locomoção de camundongos *wild type* <sup>91</sup>. Além disso, o receptor está relacionado com uma série de desordens do sistema nervoso central, incluindo amnésia, depressão, doença de Alzheimer, deficiências cognitivas relacionadas com a idade e dependência de álcool e cocaína <sup>92</sup>.

## *7. CONCLUSÕES*

---

Avaliamos os efeitos metabólicos e biológicos de metabólitos da via das triptaminas sobre linhagens tumorais de melanoma humano (SK-Mel-147 e SK-Mel-19) e sobre a relação dessas com o sistema imunológico e chegamos as seguintes conclusões:

**Em linhagens de melanomas:**

- A adição de TRY e DMT reduzem a concentração de QA e isto pode estar relacionado com o efeito clonogênico;
- A adição de TRY aumenta a síntese de SER;
- O efeito de TRY no clonogênico é dose-dependente para a linhagem SK-Mel-19;
- TRY leva a morte celular principalmente por apoptose;
- TRY e DMT não modificam o ciclo celular dos melanomas;
- TRY e DMT reduzem a invasão das células SK-Mel-19 e este efeito não é mediado via MMP-2 ou TIMPs 1 e 2.

**Em uma condição de co-cultura (melanoma+ SI):**

- TRY e IAA aumentam a atividade citotóxica de PBMCs sobre melanomas;
- TRY e IAA diminuem a secreção de TNF- $\alpha$  na condição de co-cultura;
- Na análise do metabolismo, TRY aumentou a produção de SER tanto em melanomas isolados como em co-cultura.

**Em relação a interação dos metabólitos com o receptor de aril hidrocarbonetos:**

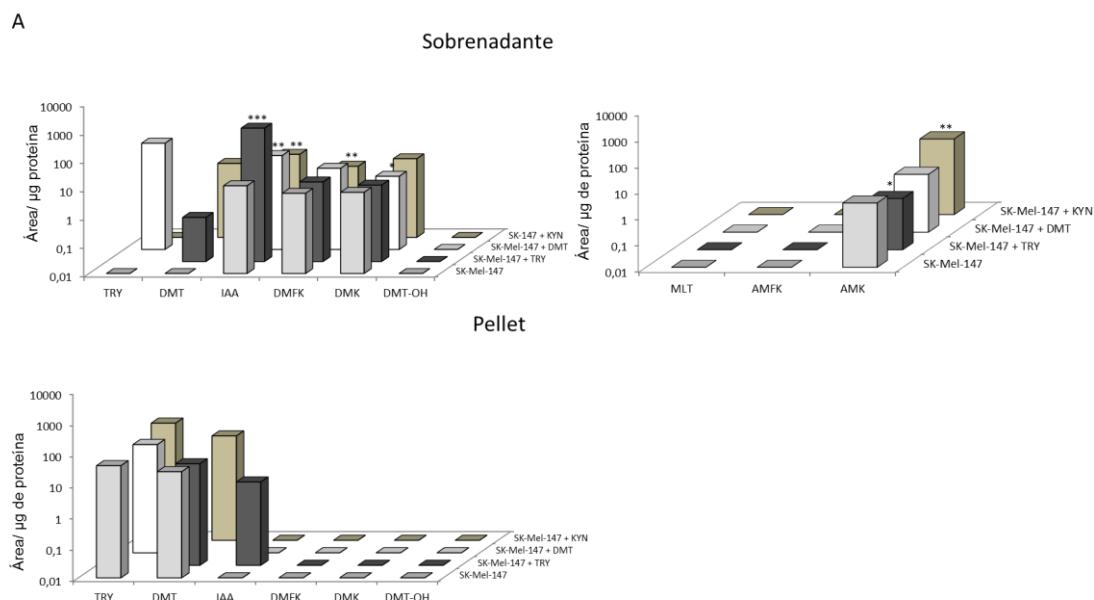
- As linhagens tumorais estudadas expressam o receptor AHR;
- Não foi possível estabelecer se DMT é um ligante do receptor AHR;
- Os efeitos biológicos de TRY e DMT parecem não estar correlacionados com este receptor.

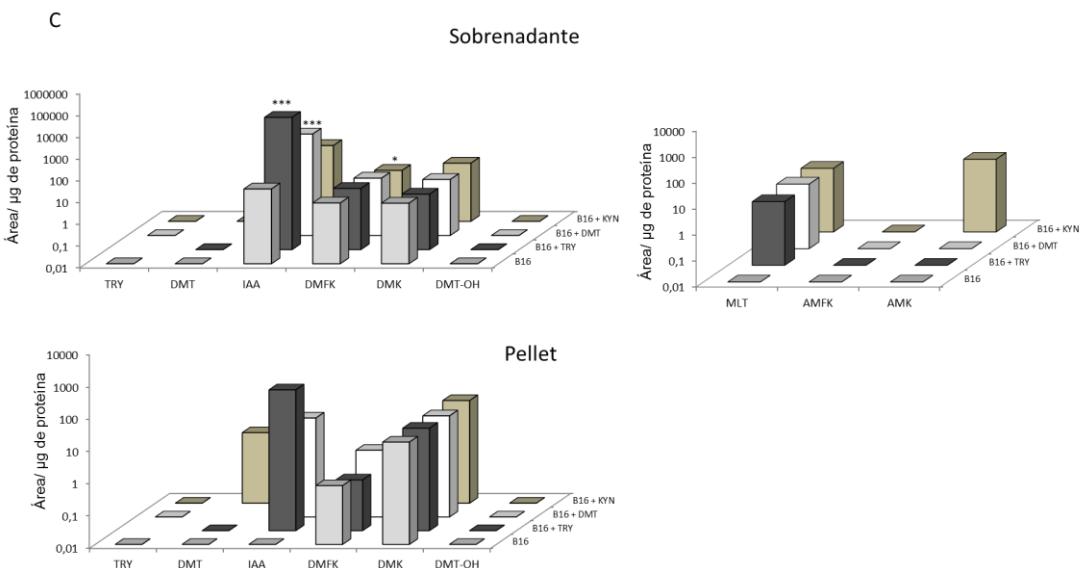
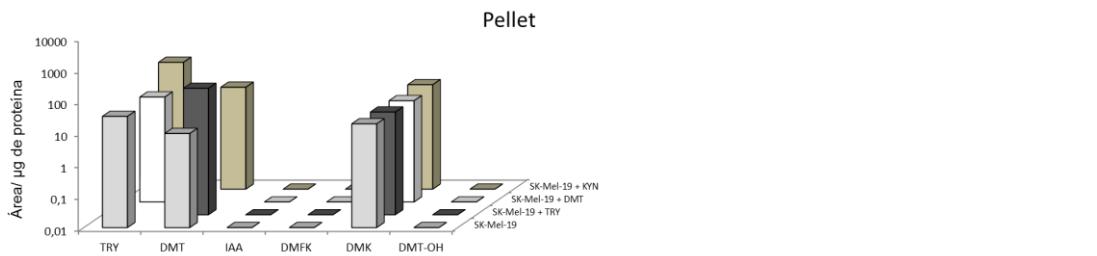
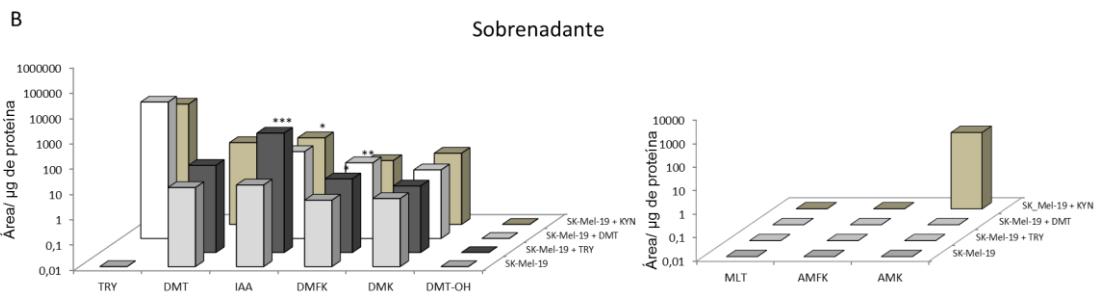
---

*8. MATERIAL SUPLEMENTAR*

### 8.1. Efeito de TRY, DMT e KYN na formação de PAN em melanomas

Para que pudéssemos reconhecer algumas mudanças metabólicas para compostos que foram detectados, porém não puderam ser quantificados, analisamos os dados obtidos no capítulo I, levando em consideração apenas a área dos metabólitos da via das triptaminas e dos produtos de abertura do anel indólico. Apresentamos os dados também dos produtos de abertura de anel indólico advindos da melatonina para realizar um comparativo (Figura 23).





**Figura 23:** Efeito da adição de TRY; DMT ou KYN (100 µM) em na via das triptaminas e formação de PANs em células SK-Mel-147 (A); SK-Mel-19 (B) e B16 (C). O período de incubação com os tratamentos foi de 24 h. (\*) P <0,05; (\*\*) P <0,01; (\*\*\*) P <0,001

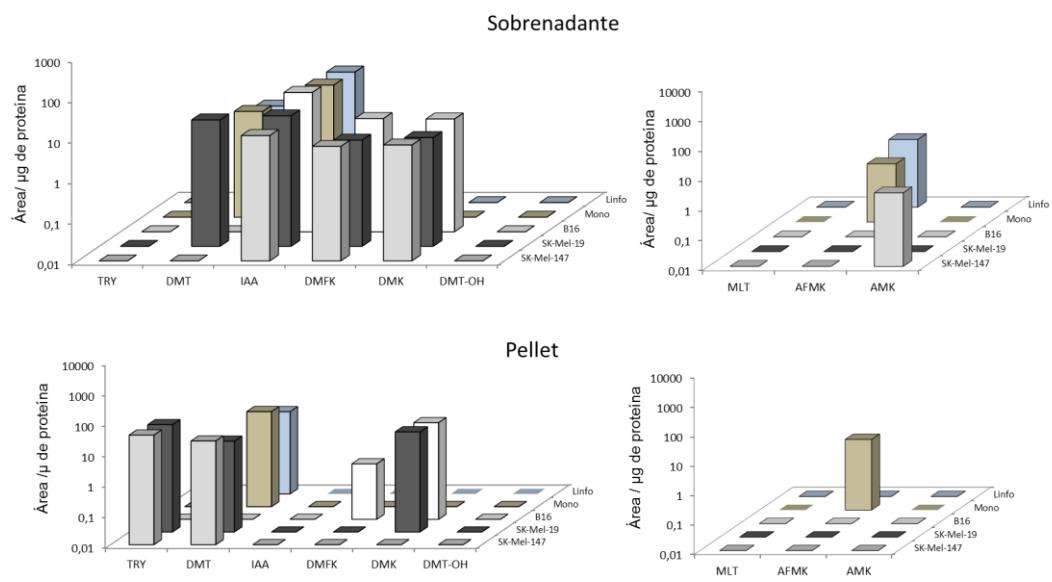
A formação de PANs foi pouco afetada na presença dos tratamentos. Um dado interessante, é que KYN induziu a síntese se AMK em todas as linhagens analisadas (Figura 23). Trabalhos do grupo demonstraram que AFMK e AMK mantêm as atividades biológicas reconhecidas para a MLT e SER sobre células do sistema imune, muitas vezes em intensidades superiores à própria MLT<sup>43; 44; 45</sup>. O AFMK está presente em altas concentrações em líquido cefalorraquidiano de indivíduos com meningite viral, além disso o composto inibe a síntese das citocinas pró inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-8 em cultura de neutrófilos<sup>44; 93</sup>. Estas mesmas citocinas promovem o crescimento celular, a invasão e o potencial metastático em melanomas sugerindo que a formação de PANs da MLT poderia ter um papel imunomodulatório na progressão tumoral<sup>93; 94</sup>.

Na linhagem SK-Mel-19, TRY e DMT aumentaram a síntese de DMFK (Figura 23B), provavelmente devido ao maior aporte de substrato para a formação dos PANs subsequentes da via. O papel biológico dos metabólitos DMFK e DMK ainda não foi identificado, porém, a exemplo do que ocorre com AFMK e AMK, a síntese destes compostos deve ter alguma importância no metabolismo e/ou manutenção da homeostase celular. Todas as linhagens tumorais estudadas foram capazes de sintetizar PANs, porém a linhagem SK-Mel-147 teve maior competência para sintetizar estes metabólitos uma vez que no estado basal conseguimos detectar a presença DMFK e AMK (Figura 23A). Já a linhagem SK-Mel-19 tende a manter intacto seus metabólitos de origem DMT e MLT (Figura 23B). Estes resultados nos levam a pensar que as células possam ter atividade peroxidásica diferenciada, uma vez que o principal

mecanismo de formação destes produtos é por peroxidases. De fato, estudos realizados durante o mestrado demonstraram que apenas as células SK-Mel-147 expressam a enzima MPO, porém tanto SK-Mel-147 quanto a SK-Mel-19 apresentam atividade peroxidásica de mesma magnitude<sup>6</sup>. Estes dados confirmam que a produção de PANs, embora não seja exclusivamente devida à MPO, é influenciada pela presença da enzima<sup>21</sup>.

### ***8.2. Vias das triptaminas e formação de produtos de abertura do anel indólico em células tumorais e normais***

Visando buscar diferenças metabólicas que possam estar associadas ao fenótipo tumoral, comparamos a síntese dos metabólitos da via das triptaminas e a formação de PANs tanto em células tumorais quanto em células mononucleares. Além disso, analisamos ainda os PANs provenientes da metabolização da MLT, AFMK e sua forma deformilada, AMK (Figura 24).



**Figura 24:** Via das triptaminas e formação de PANs em melanomas (SK-Mel-147; SK-Mel-19 e B16) e células mononucleares (monócito e linfócitos).

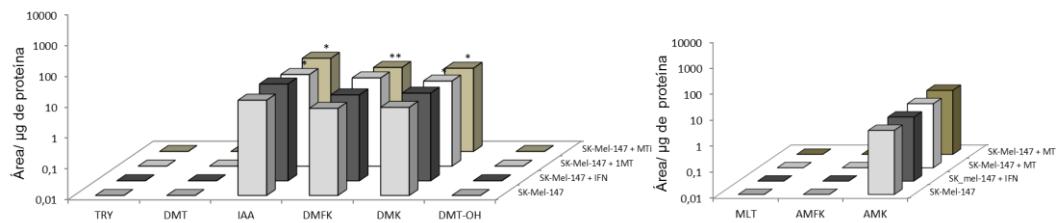
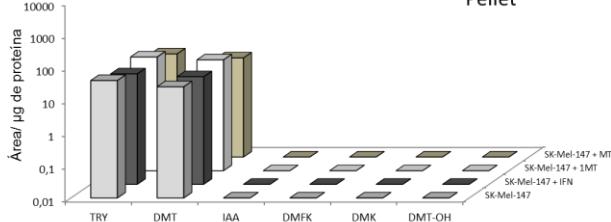
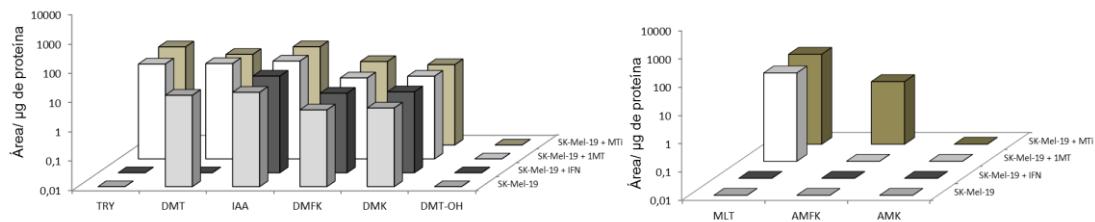
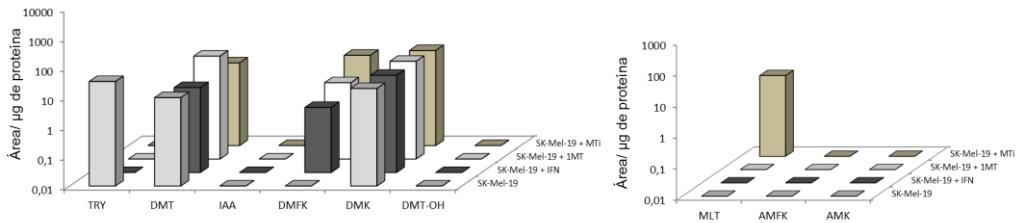
A produção de DMT não é um fenômeno exclusivo de células transformadas, tanto células tumorais quanto normais apresentam este metabólito em seu sobrenadante e/ou meio intracelular. Porém, um dado interessante é a formação de PANs da via das triptaminas: DMFK e DMK são sintetizados exclusivamente nas células tumorais estudadas (Figura 24), indicando que a presença destes metabólitos poderia contribuir para o fenótipo tumoral. Uma vez que a formação de AFMK e AMK não foi afetada, a deficiência na formação de PANs de DMT não pode ser atribuída a baixa atividade peroxidásica nestas células. Mais estudos são necessários para confirmar a veracidade destes achados. Como exemplo, podemos avaliar a produção de PANs em neutrófilos,

que são ricos em MPO e possuem alta atividade peroxidásica. Caso os neutrófilos não sintetizem DMFK e DMK, este será um forte indicio de que o perfil de metabolização pode estar ligado a transformação celular. Também em melanócitos estes PANs não foram encontrados (dados não apresentados).

O perfil diferenciado de metabolização do TRP entre células tumorais e não tumorais já foi descrito por Sahm et al (2013). Este estudo mostrou que gliomas humanos tem a capacidade específica em usar ácido quinolínico (QA) como precursor para síntese de NAD<sup>+</sup>, enquanto os astrócitos não neoplásicos utilizam a ácido nicotínico (NA). A identificação de perfis metabólicos nos permitirá ter um conhecimento mais aprofundado sobre a relação do metabolismo com o tipo celular.

### ***8.3. Efeito de IFN- $\gamma$ , 1-MT e 1-MT + IFN- $\gamma$ na via das triptaminas e na formação de PANs***

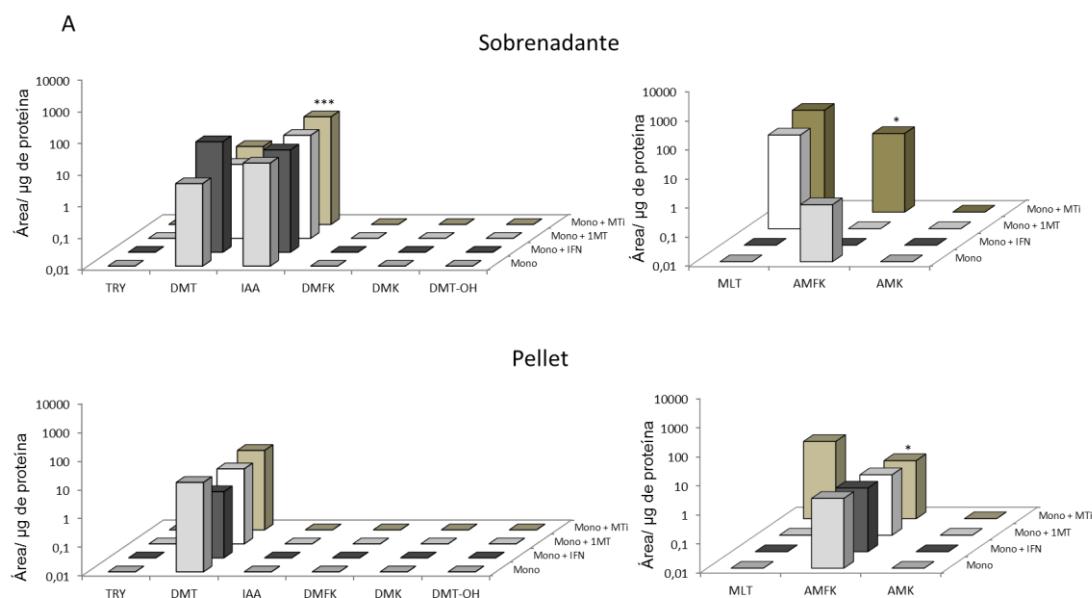
Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o inibidor da enzima IDO, 1-MT, aumenta a concentração de MLT em linhagens de melanoma humano <sup>69</sup>. Tendo em vista este acontecimento, buscamos identificar se o indutor e o inibidor clássico da enzima IDO também poderiam impactar na via das triptaminas. Nas figuras abaixo (Figura 25) podemos observar as alterações que a adição de IFN- $\gamma$ , 1-MT e 1-MT com IFN- $\gamma$  causam nesta via e na formação de PANs em melanomas após 24 h em contato com as culturas.

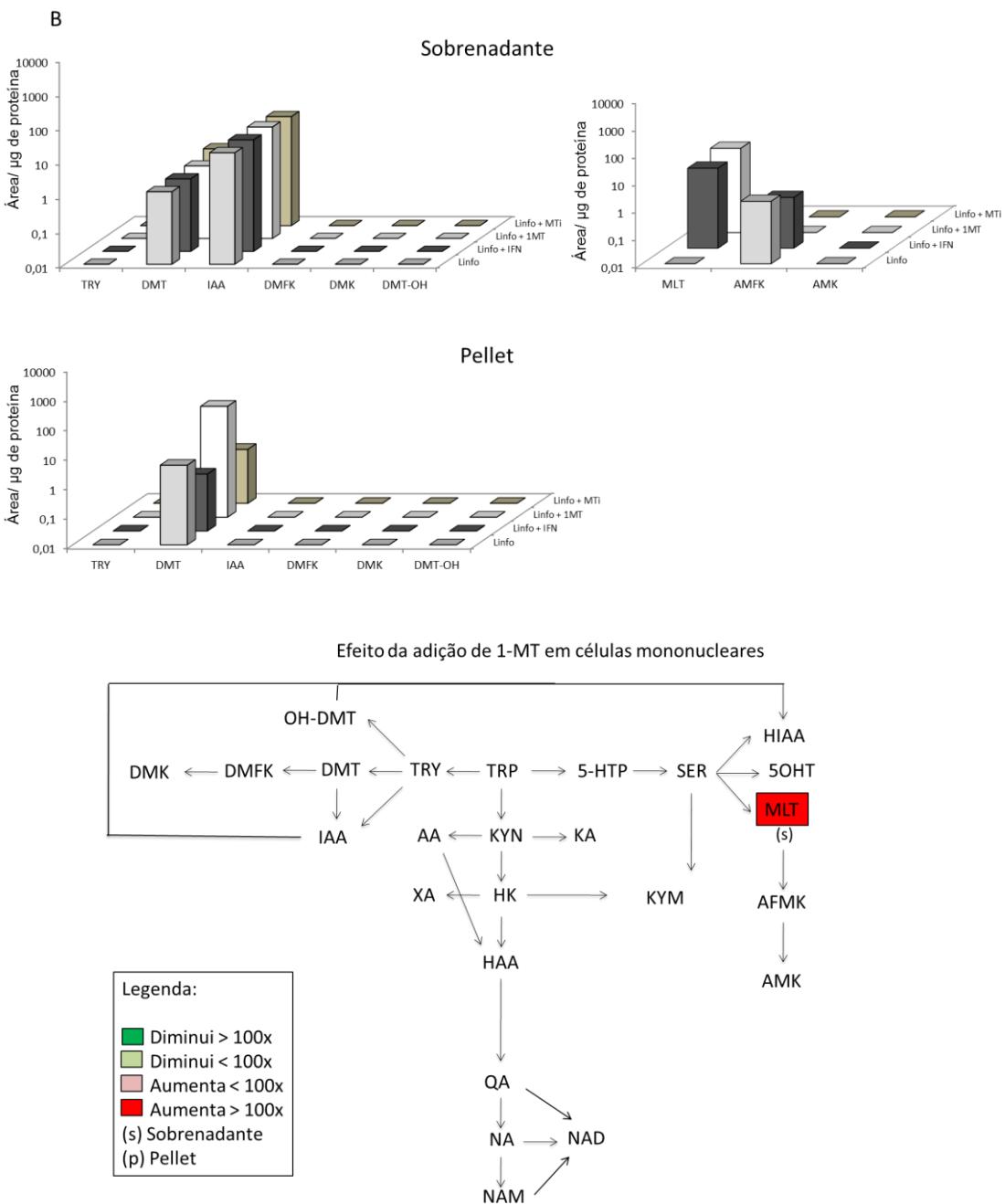
**A****Sobrenadante****Pellet****B****Sobrenadante****Pellet**

**Figura 25:** Efeito da adição de IFN- $\gamma$  (50 ng/mL) ou 1-MT (1mM) na via das triptaminas e formação de PANs em células SK-Mel-147 (A) e SK-Mel-19 (B). O período de incubação com os tratamentos foi de 24 h. (\*) P <0,05; (\*\*) P <0,01; (\*\*\*) P <0,001

Independente do impacto que IFN-  $\gamma$  e 1-MT tem sobre a via KYN, os compostos pouco afetam a via das triptaminas, o que observamos foram apenas alterações pontuais nas células estudadas. O tratamento com IFN-  $\gamma$  aumenta a concentração de IAA na linhagem SK-Mel-147 (Figura 25A). Além disso, 1-MT + IFN-  $\gamma$  também foi capaz de aumentar a concentração do metabólito, provavelmente um efeito do IFN-  $\gamma$ , já que as células tratadas somente com 1-MT não apresentaram modificações na concentração do metabólito. Esta mesma célula sofreu alterações nas concentrações dos PAN provenientes da via das triptaminas DMFK e DMK quando tratada com 1-MT + IFN-  $\gamma$ . Já a linhagem SK-Mel-19, não sofreu alteração alguma na via das triptaminas perante aos tratamentos realizados (Figura 25B). A síntese de PANs de MLT também não foi modificada, porém, a presença de 1-MT aumentou a concentração de melatonina na SK-Mel-19 (Figura 25B). O aumento de MLT pelo inibidor foi reportado em um trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa nestas duas linhagens<sup>69</sup>. No presente estudo não conseguimos observar a presença de MLT na SK-Mel-147 devido a menor sensibilidade do método em relação ao utilizado por Moreno *et al* (2013). Apesar de nossa metodologia ser menos sensível para MLT, com o presente método conseguimos analisar os metabólitos das três vias de degradação do TRP simultaneamente e ainda podemos analisar os PANs de DMT e MLT produzidos por estas células.

Além da análise realizada em células tumorais, tratamos ainda monócitos e linfócitos humanos obtidos de cultura primária com o indutor e inibidor da via KYN. A resposta no metabolismo das triptaminas e formação de PANs para estas células pode ser observada nas figuras abaixo (Figura 26).





**Figura 26:** Efeito da adição de IFN- $\gamma$  (50 ng/mL) ou 1-MT (1mM) na via das triptaminas e formação de PANs em monócitos (A) e linfócitos (B) obtidos de sangue periférico. O período de incubação com os tratamentos foi de 24 h. No painel (D), está em destaque a modificação sofrida por ambos os tipos celulares. (\*) P <0,05; (\*\*) P <0,01; (\*\*\*) P <0,001

Verificamos que a via das triptaminas também é ativa em células não tumorais e os monócitos sintetizam quase 2 vezes mais DMT que os linfócitos (Figuras 26A e 26B). Assim como ocorreu com as células SK-Mel-147 (Figura 26A), o tratamento de monócitos com 1-MT + IFN- $\gamma$  aumentou a concentração de IAA (Figura 26A). Não há na literatura nenhuma da descrição de como IFN- $\gamma$  impacta na enzima MAO. Estes achados sugerem que talvez o composto possa estar induzindo a atividade da enzima, uma vez que o IAA é formado pela degradação de SER, TRY e DMT por esta via. Os linfócitos não apresentaram grandes mudanças na presença dos tratamentos, contudo, 1-MT induziu a produção de MLT nos mesmos (Figura 26B) corroborando os dados obtidos anteriormente por nosso grupo de pesquisa em melanomas<sup>69</sup>. O mesmo efeito foi observado para os monócitos, indicando que aparentemente a ação do 1-MT no aumento de MLT independe do tipo celular. Além disso, conseguimos detectar a presença do PAN AFMK no sobrenadante das células mononucleares em seu estado basal (Figura 26A). Estes produtos somente haviam sido observados para estas células quando MLT foi adicionada ao meio de cultura<sup>95</sup>.

## *9. REFERÊNCIAS*

---

- <sup>1</sup> VITALE, A. A. et al. In Vivo Long-Term Kinetics of Radiolabeled N,N-Dimethyltryptamine and Tryptamine. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 52, n. 6, p. 970-977, Jun 1 2011. ISSN 0161-5505. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000291030000028>.
- <sup>2</sup> FRECSKA, E. et al. A possibly sigma-1 receptor mediated role of dimethyltryptamine in tissue protection, regeneration, and immunity. **Journal of Neural Transmission**, v. 120, n. 9, p. 1295-1303, Sep 2013. ISSN 0300-9564. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000323501300003>.
- <sup>3</sup> CLARA, R. O. **Metabolismo de triptofano em melanomas: O que dizem as células do microambiente?** 2015. 181 (Doutorado). Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- <sup>4</sup> WEINLICH, G. et al. Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients. **Dermatology**, v. 214, n. 1, p. 8-14, 2007. ISSN 1018-8665. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000243078900004>.
- <sup>5</sup> TOURINO, M. C. et al. Tryptamine and dimethyltryptamine inhibit indoleamine 2,3 dioxygenase and increase the tumor-reactive effect of peripheral blood mononuclear cells. **Cell Biochemistry and Function**, v. 31, n. 5, p. 361-364, Jul 2013. ISSN 0263-6484. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000322154400001>.
- <sup>6</sup> COIMBRA, J. **Triptamina e dimetiltriptamina em melanomas: biossíntese, metabolização e atividades antitumorais.** 2012. 96 (Mestrado). Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- <sup>7</sup> PETERS, J. C. Tryptophan nutrition and metabolism- an overview. **Kynurenone and Serotonin Pathways : Progress in Tryptophan Research**, v. 294, p. 345-358, 1991 1991. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1991BU28Z00032>.
- <sup>8</sup> KING, N. J. C.; THOMAS, S. R. Molecules in focus: Indoleamine 2,3-dioxygenase. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 12, p. 2167-2172, 2007. ISSN 1357-2725. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000250899300003>.
- <sup>9</sup> OPITZ, C. A. et al. Tryptophan degradation in autoimmune diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 19-20, p. 2542-2563, Oct 2007. ISSN 1420-682X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000250538200011>.

- <sup>10</sup> GOBAILLE, S. et al. Xanthurenic acid distribution, transport, accumulation and release in the rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 105, n. 3, p. 982-993, May 2008. ISSN 0022-3042. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000255139200037>.
- <sup>11</sup> NORDLIND, K.; AZMITIA, E. C.; SLOMINSKI, A. The skin as a mirror of the soul: exploring the possible roles of serotonin. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 4, p. 301-311, Apr 2008. ISSN 0906-6705. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000253611800001>.
- <sup>12</sup> TEKES, K. HPLC determination of serotonin and its metabolites from human platelet-rich plasma; Shift to 5-hydroxytryptophol formation following alcohol consumption. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, n. 2, p. 169-173, Feb 2008. ISSN 0021-9665. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000253016200017>.
- <sup>13</sup> LERNER, A. B. et al. MELATONIN IN PERIPHERAL NERVE. **Nature**, v. 183, n. 4678, p. 1821-1821, 1959 1959. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1959ZP92300046>.
- <sup>14</sup> SUGDEN, D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal-gland. **Experientia**, v. 45, n. 10, p. 922-932, Oct 15 1989. ISSN 0014-4754. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1989AZ15300004>.
- <sup>15</sup> TAN, D. X. et al. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. **Journal of Pineal Research**, v. 34, n. 4, p. 249-259, May 2003. ISSN 0742-3098. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000181835000003>.
- <sup>16</sup> SILVA, S. O. et al. High concentrations of the melatonin metabolite, N-1-acetyl-N (2)-formyl-5-methoxykynuramine, in cerebrospinal fluid of patients with meningitis: a possible immunomodulatory mechanism. **Journal of Pineal Research**, v. 39, n. 3, p. 302-306, Oct 2005. ISSN 0742-3098. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000231621600013>.
- <sup>17</sup> HEVIA, D. et al. Development and validation of new methods for the determination of melatonin and its oxidative metabolites by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, using multivariate optimization. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 8, p. 1368-1374, Feb 19 2010. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000274953400023>.
- <sup>18</sup> MUNN, D. H. et al. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 9, p. 1363-1372, May 1999. ISSN 0022-1007. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000080200900001>.

- 19 HIRATA, F. et al. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. **J Biol Chem**, v. 249, n. 4, p. 1311-3, Feb 1974. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4814344> >.
- 20 JACOB, M. S.; PRESTI, D. E. Endogenous psychoactive tryptamines reconsidered: an anxiolytic role for dimethyltryptamine. **Medical Hypotheses**, v. 64, n. 5, p. 930-937, 2005. ISSN 0306-9877. Disponível em: <<Go to ISI>://000228107500007>.
- 21 GOMES, M. M. et al. Biosynthesis of N,N-dimethyltryptamine (DMT) in a melanoma cell line and its metabolism by peroxidases. **Biochem Pharmacol**, v. 88, n. 3, p. 393-401, Apr 2014. ISSN 1873-2968. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24508833> >.
- 22 AXELROD, J. Enzymatic formation psychotomimetic metabolites from normally occurring compounds. **Science**, v. 134, 1961.
- 23 FRANZEN, F.; GROSS, H. Tryptamine, N-N-dimethyltryptamine, N-N-dimethyl-5-hydroxytryptamine and 5-methoxytryptamine in human blood and urine. **Nature**, v. 206, n. 4988, p. 1052, 1965. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A19656497600062>.
- 24 LIPINSKI, J. F. et al. Blood dimethyltryptamine concentrations in psychotic disorders. **Biological Psychiatry**, v. 9, n. 1, p. 89-91, 1974. ISSN 0006-3223. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1974W280700009>.
- 25 OON, M. C., MURRAY, R.M., RODNIGHT, R., MURPHY, M.P., BIRLEY, J.L. Factors affecting the urinary excretion of endogenously formed dimethyltryptamine in normal human subjects. **Psychopharmacology**, v. 54, p. 171-175, 1977.
- 26 BURCHETT, S. A.; HICKS, T. P. The mysterious trace amines: Protean neuromodulators of synaptic transmission in mammalian brain. **Progress in Neurobiology**, v. 79, n. 5-6, p. 223-246, Aug 2006. ISSN 0301-0082. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000241467800001>.
- 27 KARKKAINEN, J. et al. Potentially hallucinogenic 5-hydroxytryptamine receptor ligands bufotenine and dimethyltryptamine in blood and tissues. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, v. 65, n. 3, p. 189-199, Apr 2005. ISSN 0036-5513. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000228957100003>.
- 28 COSTA, M. C., M C FIGUEIREDO, E S OS CAZENAVE. Ayahuasca: uma abordagem toxicológica do uso ritualístico. **Rev Psiquiatr Clín**, v. 32, n. 6, 2005.

- 29 KAPLAN, J. et al. Blood and urine levels of N-N-dimethyltryptamine following administration of psychoactive dosages to human subjects. **Psychopharmacologia**, v. 38, n. 3, p. 239-245, 1974. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1974U205800006>.
- 30 HRYHORCZUK, L. M. et al. A NEW METABOLIC PATHWAY FOR N,N-DIMETHYLTRYPTAMINE. **Biological Psychiatry**, v. 21, n. 1, p. 84-93, Jan 1986. ISSN 0006-3223. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1986AVV5000009>.
- 31 SZARA, S. Dimethyltryptamine: its metabolism in man; the relation to its psychotic effect to the serotonin metabolism. **Experientia**, v. 12, p. 441-442, 1956.
- 32 SITARAM, B. R. et al. STUDY OF METABOLISM OF PSYCHOTOMIMETIC INDOLEALKYLAMINES BY RAT-TISSUE EXTRACTS USING LIQUID-CHROMATOGRAPHY. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 9, p. 1503-1508, May 1987. ISSN 0006-2952. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1987H554400015>.
- 33 DAI, H. H.; DAI, Z. H. The role of tryptophan catabolism in acquisition and effector function of memory T cells. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 13, n. 1, p. 31-35, Feb 2008. ISSN 1087-2418. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000253115000007>.
- 34 SILBER, B. Y.; SCHMITT, J. A. J. Effects of tryptophan loading on human cognition, mood, and sleep. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 3, p. 387-407, Feb 2010. ISSN 0149-7634. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000274675000007>.
- 35 KESZTHELYI, D.; TROOST, F. J.; MASCLEE, A. A. M. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 21, n. 12, p. 1239-1249, Dec 2009. ISSN 1350-1925. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000271644200002>.
- 36 RUDDICK, J. P. et al. Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 8, n. 20, p. 1-25, Aug 31 2006. ISSN 1462-3994. Disponível em: <<Go to ISI>://BIOABS:BACD201000094470>.
- 37 SMITH, A. J.; STONE, T. W.; SMITH, R. A. Neurotoxicity of tryptophan metabolites. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1287-1289, Nov 2007. ISSN 0300-5127. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251279800103>.
- 38 MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1147-1154, May 2007. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000246347000005>.

- 39 MULLER, A. J.; SCHERLE, P. A. Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 8, p. 613-625, Aug 2006. ISSN 1474-175X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000239200300015>.
- 40 LISSONI, P. et al. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. **Neuroendocrinology Letters**, v. 22, n. 1, p. 45-47, 2001. ISSN 0172-780X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000167337500009>.
- 41 BARTSCH, C.; BARTSCH, H.; KARASEK, M. Melatonin in clinical oncology. **Neuroendocrinology Letters**, v. 23, p. 30-38, Apr 2002. ISSN 0172-780X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000175483600008>.
- 42 SAINZ, R. M. et al. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, n. 7, p. 1407-1426, Jul 2003. ISSN 1420-682X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000184537500012>.
- 43 SILVA, S. O. et al. Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of melatonin by activated neutrophils. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 279, n. 2, p. 657-662, Dec 2000. ISSN 0006-291X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000166152600059>.
- 44 \_\_\_\_\_. Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release. **Journal of Neuroimmunology**, v. 156, n. 1-2, p. 146-152, Nov 2004. ISSN 0165-5728. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000224669800016>.
- 45 \_\_\_\_\_. Oxidation of melatonin and its catabolites, N-1-acetyl-N-(2-formyl-5-methoxykynuramine and N-1-acetyl-5-methoxykynuramine, by activated leukocytes. **Journal of Pineal Research**, v. 37, n. 3, p. 171-175, Oct 2004. ISSN 0742-3098. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000223709000005>.
- 46 FONTANILLA, D. et al. The Hallucinogen N,N-Dimethyltryptamine (DMT) Is an Endogenous Sigma-1 Receptor Regulator. **Science**, v. 323, n. 5916, p. 934-937, Feb 2009. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000263295400042>.
- 47 RIBA, J. et al. Psychometric assessment of the Hallucinogen Rating Scale. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 62, n. 3, p. 215-223, May 2001. ISSN 0376-8716. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000168188700008>.
- 48 KOPANTZEV, E. P. et al. Differences in gene expression levels between early and later stages of human lung development are opposite to those between normal lung tissue and non-small

- lung cell carcinoma. **Lung Cancer**, v. 62, n. 1, p. 23-34, Oct 2008. ISSN 0169-5002. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000260663300004>.
- 49 LARKIN, S. E. T. et al. Identification of markers of prostate cancer progression using candidate gene expression. **British Journal of Cancer**, v. 106, n. 1, p. 157-165, Jan 3 2012. ISSN 0007-0920. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000299168300022>.
- 50 DOS SANTOS, R. G. et al. Autonomic, Neuroendocrine, and Immunological Effects of Ayahuasca A Comparative Study With D-Amphetamine. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 31, n. 6, p. 717-726, Dec 2011. ISSN 0271-0749. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000296742000008>.
- 51 HEATH-PAGLIUSO, S. et al. Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. **Biochemistry**, v. 37, n. 33, p. 11508-11515, Aug 1998. ISSN 0006-2960. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000075516100014>.
- 52 BERGANDER, L. V. et al. Tryptamine Serves As a Proligand of the AhR Transcriptional Pathway Whose Activation Is Dependent of Monoamine Oxidases. **Molecular Endocrinology**, v. 26, n. 9, p. 1542-1551, Sep 2012. ISSN 0888-8809. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000308342700007>.
- 53 O'DONNELL, E. F. et al. The Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates Leflunomide-Induced Growth Inhibition of Melanoma Cells. **Plos One**, v. 7, n. 7, p. 1-13, Jul 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000306507000043>.
- 54 NGUYEN, L. P.; BRADFIELD, C. A. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 102-116, Jan 2008. ISSN 0893-228X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000252585200010>.
- 55 OPITZ, C. A. et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. **Nature**, v. 478, n. 7368, p. 197-203, Oct 2011. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000295782800040>.
- 56 CHUNG, K.-T.; GADUPUDI, G. S. Possible Roles of Excess Tryptophan Metabolites in Cancer. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 52, n. 2, p. 81-104, Mar 2011. ISSN 0893-6692. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000287158600001>.
- 57 DINATALE, B. C. et al. Kynurenic Acid Is a Potent Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand that Synergistically Induces Interleukin-6 in the Presence of Inflammatory Signaling. **Toxicological Sciences**, v. 115, n. 1, p. 89-97, May 2010. ISSN 1096-6080. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000276742200009>.

- 58 FRITZ, W. A. et al. The aryl hydrocarbon receptor inhibits prostate carcinogenesis in TRAMP mice. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 2, p. 497-505, Feb 2007. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000244124800031 >.
- 59 FTITZ, W. A. et al. The selective aryl hydrocarbon receptor modulator 6-methyl-1,3,8-trichlorodibenzofuran inhibits prostate tumor metastasis in TRAMP mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, n. 7, p. 1151-1160, Apr 1 2009. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000264457500004 >.
- 60 SAFE, S.; MCDOUGAL, A. Mechanism of action and development of selective aryl hydrocarbon receptor modulators for treatment of hormone-dependent cancers (Review). **International Journal of Oncology**, v. 20, n. 6, p. 1123-1128, Jun 2002. ISSN 1019-6439. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000175631400002 >.
- 61 ZHANG, S. et al. The aryl hydrocarbon receptor as a target for estrogen receptor-negative breast cancer chemotherapy. **Endocrine-Related Cancer**, v. 16, n. 3, p. 835-844, Sep 2009. ISSN 1351-0088. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000272670300010 >.
- 62 BANDARCHI, B. et al. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. **Dermatol Res Pract**, v. 2010, 2010. ISSN 1687-6113. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20936153> >.
- 63 Instituto Nacional de Câncer (INCA). Disponível em: < <http://www2.inca.gov.br> >.
- 64 SLOMINSKI, A. et al. Malignant melanoma - An update. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 125, n. 10, p. 1295-1306, Oct 2001. ISSN 0003-9985. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000171574000007 >.
- 65 RUITER, D. J.; HERLYN, M. Melanoma-stroma interactions and melanoma progression. **Update in Pathology, Proceedings**, p. 52-54, 2003 2003. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000223822500026 >.
- 66 LANDSBERG, J. et al. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. **Nature**, v. 490, n. 7420, p. 412-, Oct 18 2012. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000309918500048 >.
- 67 SPRANGER, S. et al. Up-Regulation of PD-L1, IDO, and T-reg in the Melanoma Tumor Microenvironment Is Driven by CD8(+) T Cells. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 200, Aug 28 2013. ISSN 1946-6234. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000323705100008 >.

- 68 American Cancer Society (ACS). Disponível em: <<http://www.cancer.org/>>.
- 69 MORENO, A. C. R. et al. The expanding roles of 1-methyl-tryptophan (1-MT): in addition to inhibiting kynurenine production, 1-MT activates the synthesis of melatonin in skin cells. **Febs Journal**, v. 280, n. 19, p. 4782-4792, Oct 2013. ISSN 1742-464X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000327130600006>.
- 70 SAHM, F. et al. The Endogenous Tryptophan Metabolite and NAD(+) Precursor Quinolinic Acid Confers Resistance of Gliomas to Oxidative Stress. **Cancer Research**, v. 73, n. 11, p. 3225-3234, Jun 1 2013. ISSN 0008-5472. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000319736800005>.
- 71 FUJIWARA, T. et al. Sekiguchi Lesion Gene Encodes a Cytochrome P450 Monooxygenase That Catalyzes Conversion of Tryptamine to Serotonin in Rice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 15, p. 11308-11313, Apr 9 2010. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000276286200037>.
- 72 PARK, S. et al. Production of serotonin by dual expression of tryptophan decarboxylase and tryptamine 5-hydroxylase in Escherichia coli. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 1387-1394, Mar 2011. ISSN 0175-7598. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000287199900012>.
- 73 CALLAWAY, J. C.; GROB, C. S. Ayahuasca preparations and serotonin reuptake inhibitors: A potential combination for severe adverse interactions. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 30, n. 4, p. 367-369, Oct-Dec 1998. ISSN 0279-1072. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000078069100006>.
- 74 ZHANG, S. et al. Melatonin inhibits cell growth and migration, but promotes apoptosis in gastric cancer cell line, SGC7901. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 88, n. 6, p. 281-289, Aug 2013. ISSN 1052-0295. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000321905400001>.
- 75 MAILANKOT, M. et al. Cell Cycle Arrest by Kynurenone in Lens Epithelial Cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 49, n. 12, p. 5466-5475, Dec 2008. ISSN 0146-0404. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000261193900040>.
- 76 ORDONEZ, R. et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 and nuclear factor kappa B contribute to melatonin prevention of motility and invasiveness in HepG2 liver cancer cells. **Journal of Pineal Research**, v. 56, n. 1, p. 20-30, Jan 2014. ISSN 0742-3098. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000328002100003>.

- 77 GIALELI, C.; THEOCHARIS, A. D.; KARAMANOS, N. K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. **Febs Journal**, v. 278, n. 1, p. 16-27, Jan 2011. ISSN 1742-464X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000285249100003>.
- 78 BOURBOULIA, D.; STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Seminars in Cancer Biology**, v. 20, n. 3, p. 161-168, Jun 2010. ISSN 1044-579X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000283402200006>.
- 79 HOFMANN, U. B. et al. Matrix metalloproteinases in human melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 3, p. 337-344, Sep 2000. ISSN 0022-202X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000089100300001>.
- 80 MUN, A. R. et al. Fluoxetine-induced Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells. **Anticancer Research**, v. 33, n. 9, p. 3691-3697, Sep 2013. ISSN 0250-7005. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000327055200020>.
- 81 GRYGIER, B. et al. Inhibitory effect of antidepressants on B16F10 melanoma tumor growth. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 3, p. 672-681, May-Jun 2013. ISSN 1734-1140. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000330270400015>.
- 82 MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-444, Jul 24 2008. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000257860300038>.
- 83 KARIN, M.; GRETEN, F. R. NF kappa B: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 10, p. 749-759, Oct 2005. ISSN 1474-1733. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000232229600011>.
- 84 SCHADENDORF, D. et al. IL-8 PRODUCED BY HUMAN-MALIGNANT MELANOMA-CELLS IN-VITRO IS AN ESSENTIAL AUTOCRINE GROWTH-FACTOR. **Journal of Immunology**, v. 151, n. 5, p. 2667-2675, Sep 1 1993. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1993LV43400032>.
- 85 KIM, S. H. et al. Novel compound 2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide (CH-223191) prevents 2,3,7,8-TCDD-induced toxicity by antagonizing the aryl hydrocarbon receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 69, n. 6, p. 1871-1878, Jun 2006. ISSN 0026-895X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000237688100012>.
- 86 CONTADOR-TROCA, M. et al. The dioxin receptor has tumor suppressor activity in melanoma growth and metastasis. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 12, p. 2683-2693, Dec 2013. ISSN 0143-3334. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000328278900001>.

- 87 VILLANO, C. M. et al. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces matrix metalloproteinase (MMP) expression and invasion in A2058 melanoma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 210, n. 3, p. 212-224, Feb 1 2006. ISSN 0041-008X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000235413900005>.
- 88 VAN WAARDE, A. et al. Sigma receptors in oncology: therapeutic and diagnostic applications of sigma ligands. **Curr Pharm Des**, v. 16, n. 31, p. 3519-3537, 2010. ISSN 1873-4286. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21050178>>.
- 89 SU, T.-P.; HAYASHI, T.; VAUPEL, D. B. When the Endogenous Hallucinogenic Trace Amine N,N-Dimethyltryptamine Meets the Sigma-1 Receptor. **Science Signaling**, v. 2, n. 61, p. 1-4, Mar 10 2009. ISSN 1937-9145. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000275473000001>.
- 90 CUEVAS, J. et al. Afobazole Modulates Neuronal Response to Ischemia and Acidosis via Activation of sigma-1 Receptors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 339, n. 1, p. 152-160, Oct 2011. ISSN 0022-3565. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000294998900017>.
- 91 MAVLYUTOV, T. A. et al. Development of the sigma-1 receptor in C-terminals of motoneurons and colocalization with the N-N-dimethyltryptamine forming enzyme, indole-N-methyl-transferase. **Neuroscience**, v. 206, p. 60-68, Mar 2012. ISSN 0306-4522. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000302202900007>.
- 92 KOURRICH, S. et al. The sigma-1 receptor: roles in neuronal plasticity and disease. **Trends in Neurosciences**, v. 35, n. 12, p. 762-771, Dec 2012. ISSN 0166-2236. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000312355300007>.
- 93 KATERINAKI, E. et al. TNF-alpha increases human melanoma cell invasion and migration in vitro: the role of proteolytic enzymes. **British Journal of Cancer**, v. 89, n. 6, p. 1123-1129, Sep 15 2003. ISSN 0007-0920. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000185318900030>.
- 94 SINGH, R. K.; VARNEY, M. L. IL-8 expression in malignant melanoma: implications in growth and metastasis. **Histology and Histopathology**, v. 15, n. 3, p. 843-849, Jul 2000. ISSN 0213-3911. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000088515700020>.
- 95 XIMENES, V. F. et al. Superoxide-dependent oxidation of melatonin by myeloperoxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 46, p. 38160-38169, Nov 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000233239800008>.

*10. ANEXOS*

## **10.1. Currículo Lattes e Ficha do aluno**

**Janine Baptista Coimbra**  
Curriculum Vitae

---

**Nome** Janine Baptista Coimbra

**Nome em citações bibliográficas** COIMBRA, J. B.; COIMBRA, JANINE B.

**Sexo** Feminino

**Cor ou Raça** Parda

**Filiação** RONER LUGON COIMBRA e JANE CUNHA BAPTISTA COIMBRA

**Nascimento** 09/03/1988 - VITORIA/ES - Brasil

**Carteira de Identidade** 2026819 SSP - ES - 01/08/2002

**CPF** 124.116.497-54

**Endereço residencial** Rua Paschoal Delmaestro  
Jardim Camburi - Vitória  
29090460, ES - Brasil  
Telefone: 27 33370368  
Celular 27 981507124

**Endereço profissional** Polícia Civil do Estado do Espírito Santo  
Rua José Farias - de 2 ao fim - lado par  
Santa Luíza - Vitória  
29045300, ES - Brasil  
Telefone: 27 31379017

**Endereço eletrônico**  
E-mail para contato: jnine.bc@gmail.com  
E-mail alternativo: janine.coimbra@pc.es.gov.br

---

### **Formação acadêmica/titulação**

- 2012** Doutorado em Farmácia (Análises Clínicas).  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
Título: Mecanismo da ação antitumoral das triptaminas sobre melanomas  
Orientador: Ana Campa  
Bolsista do (a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
*Áreas do conhecimento: Farmácia*
- 2010 - 2012** Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas.  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
Título: Triptamina e dimetiltriptamina em melanomas: biossíntese, metabolização e

atividades antitumorais, Ano de obtenção: 2912  
Orientador: Ana Campa  
Bolsista do (a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
Áreas do conhecimento: Farmácia

**2006 - 2010** Graduação em FARMÁCIA.  
Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, EMESCAM, Vitoria, Brasil  
Título: Polimorfismo no gene da adiponectina e o risco de diabetes tipo 2 em pacientes obesos  
Orientador: Flavia Imbroisi Valle Errera

---

#### Atuação profissional

##### 1. Polícia Civil do Estado do Espírito Santo - PC/ES

---

###### Vínculo institucional

**2014 - Atual** Vínculo: Servidor público, Enquadramento funcional: Perito Bioquímico-Toxicologista, Carga horária: 40, Regime: Integral

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

---

###### Vínculo institucional

**2012 - Atual** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Doutoranda, Regime: Dedicação exclusiva

**2010 - 2012** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Mestranda, Regime: Dedicação exclusiva

##### 3. Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória - H. SANTA CASA

---

###### Vínculo institucional

**2010 - 2010** Vínculo: Estagiária, Enquadramento funcional: Estagiária (Hematologia), Carga horária: 12, Regime: Parcial

##### 4. Centro de Atendimento Toxicológico do ES - TOXCEN

---

###### Vínculo institucional

**2009 - 2009** Vínculo: Estagiária, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 20, Regime: Parcial

##### 5. Farmácia Avenida - FARMÁCIA AVENIDA

---

###### Vínculo institucional

**2009 - 2009** Vínculo: Estagiária, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 30, Regime: Parcial

## **6. Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória - EMESCAM**

### **Vínculo institucional**

**2007 - 2008** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Iniciação científica, Carga horária: 20, Regime: Dedicação exclusiva

### **Áreas de atuação**

- 1.** Toxicologia
- 2.** Bioquímica
- 3.** Farmácia

### **Projetos**

Projetos de pesquisa

**2012 - Atual** Mecanismo da ação antitumoral das triptaminas sobre melanomas

Descrição: O metabolismo do triptofano se dá por três vias metabólicas: a via das quinureninas, via serotonérgica e via das triptaminas. A primeira gera quinurenina e uma gama de produtos secundários e contribui para os fenômenos de tolerância e imune escape de células tumorais. A via serotonérgica leva à produção de serotonina, que pode gerar melatonina e outros metabólitos; no que concerne ao câncer, há evidências de que estes compostos podem controlar o crescimento tumoral. No que se refere à via das triptaminas, ainda não existe uma relação estabelecida com o câncer, porém, recentemente nosso grupo de pesquisa identificou que triptamina (TRY) e dimetiltriptamina (DMT) inibem a enzima IDO e que, portanto, poderiam ter uma ação antitumoral (Tourino M, dissertação; 2012). Este efeito foi observado sobre a IDO recombinante humana e em células tumorais de glioma humano A172. O mais importante foi que tanto TRY quanto DMT aumentaram o efeito citotóxico de linfócitos sobre a célula tumoral. Concomitantemente, durante meu mestrado, mostramos que TRY e DMT eram produzidas por algumas linhagens de melanomas e que estes compostos, quando adicionados à cultura celular, inibiam a migração e a proliferação dessas linhagens. Estes achados amparam a proposta do presente projeto. Nossa objetivo é avançar sobre a questão de como a rota das triptaminas afeta o crescimento tumoral e determinar os mecanismos envolvidos.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (0); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (3);

Integrantes: Janine Baptista Coimbra (Responsável); Ana Campa; Rena Orsatti Clara; Ana Carolina Ramos Moreno; Ariane Rivellis Julio

**2010 - 2012** Triptamina e dimetiltriptamina em melanomas: biossíntese, metabolização e atividades antitumorais

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Janine Baptista Coimbra (Responsável); Ana Campa; Renan Orsati Clara; Ana Carolina Ramos Moreno

**2007 - 2008** Polimorfismo no gene da adiponectina e o risco de diabetes tipo 2 em pacientes obesos

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1);

Integrantes: Janine Baptista Coimbra; Flávia Imbroisi Valle Errera (Responsável); Perseu Seixas Carvalho; Maria Rita Passos-Bueno; Eliete Rabi Bortolini

Financiador (es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo-FAPES/ES, Fundo de Apoio à Ciência e Tecnologia do Município de Vitória-FACITEC, Programa Interno de Bolsas de Iniciação Científica-PIBIC

Número de produções C, T & A: 1/

---

#### Idiomas

Inglês

Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem

---

#### Prêmios e títulos

**2008** Prêmio de Iniciação Científica, Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória

#### Produção

---

##### Produção bibliográfica

###### Artigos completos publicados em periódicos

1. GOMES, MELISSA M., COIMBRA, JANINE B., CLARA, RENAN O., DÖRR, FELIPE A., MORENO, ANA CAROLINA R., CHAGAS, JAIR R., TUFIK, SÉRGIO, JR, ERNANI PINTO, CATALANI, LUIZ H., CAMPA, ANA

Biosynthesis of N,N-dimethyltryptamine (DMT) in a melanoma cell line and its metabolism by peroxidases. *Biochemical Pharmacology*. v.88, p.393 - 401, 2014.

Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1016/j.bcp.2014.01.035]

2. MORENO, ANA C. R., CLARA, RENAN O., COIMBRA, JANINE B., JÚLIO, ARIANE R., ALBUQUERQUE, RENATA C., OLIVEIRA, EDSON M., MARIA-ENGLER, SILVY A S., CAMPA, ANA

The expanding roles of 1-methyl-tryptophan (1-MT): In addition to inhibiting kynurenine production, 1-MT activates the synthesis of melatonin in skin cells. *The FEBS Journal (Print)*. , v.280, p.n/a - n/a, 2013.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

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

1. COIMBRA, JANINE B., GOMES, M. M., CLARA, R. O., DORR, F. A., Ana Carolina Ramos Moreno, CHAGAS, J. R., CATALANI, L. H., Ana Campa

Biosynthesis of dimethyltryptamine in a melanoma cell line and its metabolism by peroxidase In: *Cancer and Metabolism*, 2013, Amsterdam.

**Cancer and Metabolism 2013.** Cambridge: Abcam plc, 2013.

Palavras-chave: Dimethyltryptamine, Melanoma

Referências adicionais: Holanda/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

2. Ariane Rivellis Julio, Renan Orsati Clara, COIMBRA, J. B., Alexandre Froes Marchi, Ana Carolina Ramos Moreno, Ana Campa, Ernani Pinto

IDO and TDO inhibitors induce serotonin pathway on glioma cell lines In: *Cancer and Metabolism*, 2013,

Amsterdam.

**Cancer and Metabolism 2013.** Cambridge: Abcam plc, 2013.

Palavras-chave: IDO, TDO

Áreas do conhecimento : Farmácia

Referências adicionais : Holanda/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

3. CLARA, R. O., COIMBRA, J. B., Ariane Rivellis Julio, ALBUQUERQUE, R. C., OLIVEIRA, EDSON M., MARIA-ENGLER, SILVY A S., CAMPA, A., MORENO, A. C. R.

The expanding roles of 1-methyl-tryptophan (1-MT): In addition to inhibiting kynurenine production, 1-MT activates the synthesis of melatonin in skin cells In: *Cancer and Metabolism*, 2013, Amsterdam.

**Cancer and Metabolism 2013.** Cambridge: Abcam plc, 2013.

Palavras-chave: 1-MT, Melatonin

Áreas do conhecimento : Farmácia

Referências adicionais : Holanda/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

4. CLARA, R. O., MORENO, A. C. R., COIMBRA, J. B., CHAGAS, J. R., CAMPA, A.

Tryptophan metabolism: can a non-natural anticancer drug enhance the production of a natural one?! In: International Congress Natural Anticancer Drugs, 2012, Olomouc.

**Biomedical papers.** Olomouc: Palacký University Press, 2012. v.156. p.S1 - S100

Áreas do conhecimento : Bioquímica

Referências adicionais : República Tcheca/Inglês. Meio de divulgação: Impresso. Home page: [<http://biomed.papers.upol.cz>]

5. COIMBRA, J. B., MORENO, A. C. R., CLARA, R. O., ALBUQUERQUE, R. C., CAMPA, A.

Tryptophan metabolism on cancer: the expression and effects of tryptamine pathway on melanoma and glioblastoma cell lines In: International Congress Natural Anticancer Drugs, 2012, Olomouc.

**Biomedical papers.** Olomouc: Palacký University Press, 2012. v.156. p.S1 - S100

Áreas do conhecimento : Bioquímica

Referências adicionais : República Tcheca/Inglês. Meio de divulgação: Impresso. Home page: [<http://biomed.papers.upol.cz>]

6. ROCIO, S.C.G.P., CEOLIN, M.F.R., ROSA, E. D., ZUCCOLLOTO, C. O., COIMBRA, J. B., ANDRADE, M. P., ITHO, S.F.

Perfil das intoxicações por paracetamol com alterações hepáticas registradas no Centro Toxicológico do Espírito Santo, de 2002 a 2007. In: Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2009, Belo Horizonte.

**Revista Brasileira de Toxicologia.** , 2009. v.22. p.159 - 159

Palavras-chave: Paracetamol, Intoxicações, Alterações hepáticas

Áreas do conhecimento : Farmácia, Toxicologia

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

7. COIMBRA, J. B., POMPERMAYER, S., RODRIGUES, B. P., CARVALHO, P. S., PASSOS-BUENO, M. R., BORTOLINI, E. R., COSTA, L. R. S., ERRERA, F. I. V.

Polimorfismo no gene da adiponectina e o risco de diabetes tipo 2 em pacientes obesos In: II Congresso de Ciências da Saúde, 2008, Vitória.

**II Congresso de Ciências da Saúde.** , 2008.

Palavras-chave: Diabetes, Obesidade, Polimorfismo

Áreas do conhecimento : Farmácia, Genética

Setores de atividade : Atividades profissionais, científicas e técnicas

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page:

[<http://www.emescam.br/site/arquivo/pesquisa/eventos/congressoII/e-BookAnaisIICongressoCienciasDaSaude2008.pdf>]

8. COIMBRA, J. B., POMPERMAYER, S., RODRIGUES, B. P., PEREIRA, R. H. A., BASTOS, G. A., CARVALHO, P. S., ERRERA, F. I. V.

Prevalência de Alterações da Glicemia em Pacientes com Obesidade In: I Congresso de Ciências da Saúde, 2007, Espírito Santo.

**Congresso de Ciências da Saúde. , 2007.**

Palavras-chave: *Obesidade, alterações da glicemia*

Áreas do conhecimento: *Farmácia*

Setores de atividade: *Atividades profissionais, científicas e técnicas*

Referências adicionais: *Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home Page: [http://www.emescam.br/arquivo/arquivo/pesquisa/producao/anais/2007.pdf]*

**Apresentação de trabalho e palestra**

1. MENDONCA, J. B., PAULA, D. M. L., PERES, M. D., VIERIA, A. A., COIMBRA, J. B., OLIVEIRA, J. C., PELICAO, F. S., PISSINATI, J. F., BAZZARELLA, R. B., FARIA, M. G. C.

**Análise toxicológica na elucidação de crimes do tipo 'boa noite cinderela :relato de caso, 2014.** (Outra, Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: *boa noite cinderela, análise toxicológica, benzodiazepínicos*

Áreas do conhecimento: *Toxicologia*

Referências adicionais: *Brasil/Português; Local: Goiabeiras; Cidade: Vitória- ES; Evento: IV Encontro Estadual de Perícias Criminais; Inst. promotora/financiadora: Universidade do Espírito Santo (UFES)*

2. VIERIA, A. A., COIMBRA, J. B., OLIVEIRA, J. C., PERES, M. D., PAULA, D. M. L., MENDONCA, J. B., PELICAO, F. S., PISSINATI, J. F., BAZZARELLA, R. B., FARIA, M. G. C.

**Casos de óbitos registrados no Laboratório de Toxicologia associado ao uso de êxtase no ano de 2012, 2014.** (Outra, Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: *êxtase, óbitos*

Áreas do conhecimento: *Toxicologia*

Referências adicionais: *Brasil/Português; Local: Goiabeiras; Cidade: Vitória- ES; Evento: IV Encontro Estadual de Perícias Criminais*

3. COIMBRA, J. B., PERES, M. D., OLIVEIRA, J. C., VIERIA, A. A., PAULA, D. M. L., MENDONCA, J. B., PELICAO, F. S., PISSINATI, J. F., BAZZARELLA, R. B., LEBARCH, E. C., FARIA, M. G. C.

**Prevalência do uso de álcool em vítimas fatais de acidentes de trânsito no Espírito Santo, 2014.** (Outra, Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: *álcool, trânsito, vítimas fatais*

Áreas do conhecimento: *Toxicologia*

Referências adicionais: *Brasil/Português; Local: Goiabeiras; Cidade: Vitória- ES; Evento: IV Encontro Estadual de Perícias Criminais; Inst. promotora/financiadora: Universidade do Espírito Santo (UFES)*

4. COIMBRA, J. B., GOMES, M. M., CLARA, R. O., DORR, F. A., MORENO, A. C. R., CHAGAS, J. R., CATALANI, L. H., CAMPA, A.

**Biosynthesis of dimethyltryptamine in a melanoma cell line and its metabolization by peroxidase, 2013.** (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

*Referências adicionais : Brasil/Inglês; Local: Brazil; Cidade: São Paulo; Evento: XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia; Inst.promotora/financiadora: Universidade de São Paulo*

**5. COIMBRA, J. B., GOMES, M. M., CLARA, R. O., DORR, F. A., MORENO, A. C. R., CHAGAS, J. R., CATALANI, L. H., CAMPA, A.**

**Biosynthesis of dimethyltryptamine in a melanoma cell line and its metabolism by peroxidase,** 2013. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

*Referências adicionais : Holanda/Inglês; Local: Holanda; Cidade: Amsterdam; Evento: Cancer and Metabolism; Inst.promotora/financiadora: Abcam*

**6. ALBUQUERQUE, R. C., MORENO, A. C. R., JULIO, A. R., CLARA, R. O., COIMBRA, J. B.,** Alexandre Froes Marchi, Ernani Pinto, MARIA-ENGLER, SILVY A S., CAMPA, A.

**Expected and previous unreported effects of IFN- $\gamma$  on normal and tumor cells,** 2013. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

*Referências adicionais : Brasil/Inglês; Local: Brazil; Cidade: Natal; Evento: 11 th world congress on inflammation; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Imunologia*

**7. JULIO, A. R., Renan Orsatti Clara, COIMBRA, J. B.,** Alexandre Froes Marchi, MORENO, A. C. R., CAMPA, A., Ernani Pinto

**IDO and TDO inhibitors induce serotonin pathway on glioma cell lines,** 2013. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

*Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Holanda; Cidade: Amsterdam; Evento: Cancer and Metabolism; Inst.promotora/financiadora: Abcam*

**8. CLARA, R. O., COIMBRA, J. B., JULIO, A. R., ALBUQUERQUE, R. C., OLIVEIRA, EDSON M.,** MARIA-ENGLER, SILVY A S., CAMPA, A., MORENO, A. C. R.

**The expanding roles of 1-methyl-tryptophan (1-MT): In addition to inhibiting kynurene production, 1-MT activates the synthesis of melatonin in skin cells,** 2013. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

*Referências adicionais : Holanda/Inglês; Local: Holanda; Cidade: Amsterdam; Evento: Cancer and Metabolism; Inst.promotora/financiadora: Abcam*

**9. COIMBRA, J. B., MORENO, A. C. R., CLARA, R. O., ALBUQUERQUE, R. C., CAMPA, A.**

**Tryptophan metabolism on cancer: the expression and effects of tryptamine pathway on melanoma and glioblastoma cell lines,** 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

*Áreas do conhecimento : Bioquímica*

*Referências adicionais : República Tcheca/Inglês. Meio de divulgação: Impresso. Home page: <http://biomed.papers.upol.cz>; Local: Republica Tcheca; Cidade: Olomouc; Evento: International Congress Natural Anticancer Drugs; Inst.promotora/financiadora: Palacky University*

**10. COIMBRA, J. B., CLARA, R. O., CAMPA, A.**

**HPLC method for the detection of N,N-dimethyltryptamine (DMT) metabolites and cytotoxicity on glioma and neuron cell lines,** 2011. (Outra,Apresentação de Trabalho)

*Áreas do conhecimento : Farmácia*

*Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital; Local: São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: XVI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF/USP; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP*

**11. COIMBRA, J. B., Errera FIV, Carvalho PS, Passo-Bueno MR, Rabbi-Bortolini E**

**Estudo do Gene da Adiponectina em Vitória**, 2009. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

*Palavras-chave: Diabetes, Obesidade, Polimorfismo*

*Áreas do conhecimento : Farmácia, Genética*

*Setores de atividade : Atividades profissionais, científicas e técnicas*

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Espírito Santo; Cidade: Vitória; Evento: II Simpósio Estadual de Farmácia; Inst.promotora/financiadora: Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória*

12. ROCIO, S.C.G.P., CEOLIN, M.F.R., ROSA, E. D., ZUCCOLLOTO, C. O., COIMBRA, J. B., ANDRADE, M. P., ITHO, S.F.

**Perfil das intoxicações por paracetamol com alterações hepáticas registradas no Centro Toxicológico do Espírito Santo, de 2002 a 2007.**, 2009. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

*Palavras-chave: Paracetamol, Intoxicações, Alterações hepáticas*

*Áreas do conhecimento: Farmácia, Toxicologia*

*Setores de atividade: Atividades profissionais, científicas e técnicas*

*Referências adicionais: Brasil/Português; Local: Minas Gerais; Cidade: Belo Horizonte; Evento: XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia; Inst. promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Toxicologia*

13. COIMBRA, J. B., POMPERMAYER, S., RODRIGUES, B. P., Magioni FC, Carvalho PS, Errera FIV, Rabbi-Bortolini E, Passo-Bueno MR

**O polimorfismo 45T>G do gene da adiponectina não está associado à gravidade da obesidade**, 2008. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

*Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Espírito Santo; Cidade: Vitoria; Evento: I Simpósio de Genética e Biologia Molecular do Espírito Santo; Inst. promotora/financiadora: Universidade Federal do Espírito Santo*

14. COIMBRA, J. B., POMPERMAYER, S., RODRIGUES, B. P., Pereira RHA, Bastos GA, Carvalho OS, Errera FIV

**Prevalência de Alterações da Glicemia em Pacientes com Obesidade**, 2007. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

*Palavras-chave: Obesidade, alterações da glicemia*

*Áreas do conhecimento : Farmácia*

*Setores de atividade: Atividades profissionais, científicas e técnicas*

*Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Espírito Santo; Cidade: Vitória; Evento: Congresso de Ciências da Saúde; Inst. promotora/financiadora: Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória*

## **Eventos**

### **Participação em eventos**

1. **IV Encontro Estadual de Perícias Criminais**, 2014. (Encontro)

2. Apresentação de Pôster / Painel no(a) **Cancer and Metabolism**, 2013. (Congresso)

Biosynthesis of dimethyltryptamine in a melanoma cell line and its metabolization by peroxidase.

3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia**, 2013.

(Simpósio)

Biosynthesis of dimethyltryptamine in a melanoma cell line and its metabolism by peroxidase.

4. **V Workshop on melanoma, skin and photoprotection**, 2013. (Simpósio)

5. **V Simposio de Pós-graduação em Análises Clínicas**, 2013. (Simpósio)

6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **International Congress Natural Anticancer Drugs**, 2012. (Congresso)

Tryptophan metabolism on cancer: the expression and effects of tryptamine pathway on melanoma and glioblastoma cell lines.

7. **IV Simposio de pós-graduação em análises clínicas**, 2012. (Simpósio)

8. **Aplicação de espectrometria de massas de alta resolução na metabolômica**, 2012. (Seminário)

9. **Melanoma, UV induced lesion ond photoprotection**, 2012. (Outra)

10. Apresentação de Poster / Painel no (a) **XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica**, 2011. (Simpósio)

HPLC method for the detection of N-N-dimethyltryptamine (DMT) metabolites and cytotoxicity on glioma and neuron cell lines.

11. **III Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas**, 2011. (Simpósio)

12. **Segurança no manuseio, descarte e transporte de resíduos químicos**, 2011. (Seminário)

13. **Challenge for Integrating Molecular and System Biology**, 2011. (Outra)

14. **Seminário Técnico de Cromatografia**, 2010. (Seminário)

15. **IX Simpósio de Biossegurança e Descartes Laboratoriais**, 2010. (Simpósio)

16. Apresentação Oral no(a) **II Simpósio Estadual de Farmácia**, 2009. (Simpósio)

Polimorfismo no gene da adiponectina e o risco de diabetes tipo 2 em pacientes obesos.

17. **III Congresso de Ciências da Saúde**, 2009. (Congresso)

18. Apresentação de Poster / Painel no (a) **I Simpósio de Genética e Biologia Molecular do Espírito Santo**, 2008. (Simpósio)

O polimorfismo 45T>G do gene da adiponectina não está associado à gravidade da obesidade.

19. Apresentação Oral no(a) **II Congresso de Ciências da Saúde**, 2008. (Congresso)

Polimorfismo no gene da adiponectina e o risco de diabetes tipo 2 em pacientes obesos.

20. **XV Curso de Intoxicações**, 2008. (Outra)

21. Apresentação de Poster / Painel no (a) **Congresso de Ciências da Saúde**, 2007. (Congresso)

Prevalência de Alterações da Glicemia em Pacientes com Obesidade.

22. **Semana de Farmácia**, 2006. (Outra)

23. **XXIX Encontro Nacional dos Estudantes de Farmácia**, 2006. (Encontro)

---

#### Totais de produção

##### Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico.....	2
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	8
Apresentações de trabalhos (Conferência ou palestra) .....	1
Apresentações de trabalhos (Congresso) .....	7
Apresentações de trabalhos (Simpósio) .....	2
Apresentações de trabalhos (Outra) .....	4

##### Eventos

Participações em eventos (congresso) .....	5
Participações em eventos (seminário) .....	3
Participações em eventos (simpósio) .....	9
Participações em eventos (encontro) .....	2
Participações em eventos (outra) .....	4

---

#### Outras informações relevantes

##### 1 Monitorias durante a graduação:

- Monitoria da disciplina de Matemática e Bioestatística, do curso de Farmácia, do segundo semestre de 2006 ao fim do primeiro semestre de 2007, com carga horária de 72 horas em cada semestre. Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM), Departamento de Ciências Exatas e Naturais, professor titular Luiz Otavio Buffon.
- Monitoria da disciplina de Princípios de Biotecnologia, do curso de Farmácia, no primeiro semestre de 2008, com carga horária de 72 horas. Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM), Departamento de Ciências Exatas e Naturais, professora titular Débora Dummer Meira.

##### Cursos de curta duração:

- Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM), 7 a 9 de novembro de 2007 com carga horária de 6 horas/aula, “Cuidados Farmacêuticos na Diabetes”.
- Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), 28 de março de 2008 com carga horária de 2 horas, “DNA Forense”.
- Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM), 5 a 7 de novembro de 2008 com carga horária de 6 horas/aula, “Manipulação Homeopática para Uso Veterinário e Odontológico”.
- Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM), 28 a 30 de outubro de 2009 com carga horária de 6 horas/aula, “Implementação Sistemática de Laboratórios de Toxicologia”.

##### Exposição:

- Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM), 5 a 7 de novembro de 2008 com carga horária de 6 horas/aula, stand de Toxicologia e Análises Toxicológicas.

- Curso de inglês  
-Embassy CES (Nova Zelândia) - curso intensivo de 8 semanas. Nível Upper Intermediate. (2010)

11/08/2015

**Janus** - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



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

**9136 - 7344386/1 - Janine Baptista Coimbra**

**Email:** janine.coimbra@usp.br  
**Data de Nascimento:** 09/03/1988  
**Cédula de Identidade:** RG - 2.026.819 - ES  
**Local de Nascimento:** Estado do Espírito Santo  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Farmacêutico - Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória - Espírito Santo - Brasil - 2010  
**Mestrado:** Mestra em Ciências - Área: Toxicologia e Análises Toxicológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2012

**Curso:** Doutorado  
**Programa:** Farmácia (Análises Clínicas)  
**Área:** Análises Clínicas  
**Data de Matrícula:** 30/07/2012  
**Início da Contagem de Prazo:** 30/07/2012  
**Data Limite para o Depósito:** 25/07/2017  
**Orientador:** Prof(a). Dr(a). Ana Campa - 30/07/2012 até o presente. Email: anacampa@usp.br  
**Proficiência em Línguas:** Inglês, Aprovado em 30/07/2012  
**Trancamento(s):** 360 dias  
Período de 27/05/2014 até 21/05/2015  
**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 23/05/2014  
**Data do Depósito do Trabalho:**  
**Título do Trabalho:**  
**Data Máxima para Aprovação da Banca:**  
**Data de Aprovação da Banca:**  
**Data Máxima para Defesa:**  
**Data da Defesa:**  
**Resultado da Defesa:**  
**Histórico de Ocorrências:** Primeira Matrícula em 30/07/2012  
Trancado em 27/05/2014

11/08/2015

**Janus** - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



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

9136 - 7344386/1 - Janine Baptista Coimbra

Sigla	Nome da Disciplina	Inicio	Termino	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5709- 5/1	Biologia Molecular em Análises Clínicas	13/08/2012	16/09/2012	75	5	100	A	N	Concluída
FBC5757- 4/1	Tópicos em Análises Clínicas II	14/08/2012	26/11/2012	15	1	85	A	N	Concluída
IIB5030- 1/1	Curso Avançado de Sinalização Celular e Redes de Modulação Gênica (Curso Interunidades: Bioinformática - Universidade de São Paulo)	22/11/2012	12/12/2012	45	3	87	A	N	Concluída
QBQ5802- 4/1	Metodologias em Bioquímica e Biologia Molecular: Conceitos e Aplicações (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	19/03/2013	29/04/2013	60	4	92	A	N	Concluída
BMF5862- 3/2	Ciclo Celular e Apoptose (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/06/2013	24/06/2013	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5753- 3/1	Processos de Invasão Celular	05/08/2013	15/09/2013	90	6	90	A	N	Concluída
QBQ5747- 6/5	Animais de Laboratório (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	26/08/2013	02/09/2013	15	1	100	A	N	Concluída
QBQ5882- 1/1	Tópicos Avançados em Biologia Tumoral (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	01/10/2013	21/10/2013	45	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
<b>Disciplinas:</b>	0	20	20
<b>Estágios:</b>			
<b>Total:</b>	0	20	20

**Créditos Atribuídos à Tese:** 167

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

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

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

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

**Impresso em:** 11/08/2015 14:37:38



## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

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

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.
2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.
  - 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.
3. A sessão de defesa será aberta ao público.
4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.
  - 4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
  - 4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: [pgfarma@usp.br](mailto:pgfarma@usp.br), (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

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



PIGMENT CELL & MELANOMA  
Research

**Melanocytes are more responsive to IFN- $\gamma$  and produce higher amounts of kynurenine than melanoma cells.**

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

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3 **Melanocytes are more responsive to IFN- $\gamma$  and produce higher amounts of**  
4 **kynurenine than melanoma cells.**  
5  
6  
7

8 Renan O. Clara<sup>1</sup>, Nadine Assman<sup>2</sup>, Ana Carolina R. Moreno<sup>1</sup>, Janine B. Coimbra<sup>1</sup>,  
9 Nadine Nurenberger<sup>2</sup>, Katja Dettmer-Wilde<sup>2</sup>, Peter J. Oefner<sup>2</sup>, Ana Campa<sup>1</sup>.  
10  
11  
12

13 <sup>1</sup>Department of Clinical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University  
14 of São Paulo, São Paulo, Brazil.  
15

16 <sup>2</sup>Institute of Functional Genomics, University of Regensburg, Regensburg, Germany.  
17

18  
19  
20  
21  
22  
23 **Summary**

24 One of the oldest links between increased amino acid catabolism, tumor progression  
25 and immune regulation in cancer is the augmented tryptophan (Trp) catabolism.  
26 Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) plays a central role in this phenomenon by inducing indoleamine  
27 2,3-dioxygenase (IDO), the rate-limiting enzyme of Trp degradation through the  
28 kynurenine pathway. Trp consumption and kynurenine (KYN) production is related to  
29 poor prognosis in cancer, including melanomas. Besides its role in tumor immune  
30 escape, IFN- $\gamma$  is believed to play a key role in the control of pigmentation  
31 homeostasis. We still lack a comprehensive understanding of the kynurenine pathway  
32 in malignant and non-malignant cells. Here we measured changes in abundance of  
33 kynurenine metabolites of tryptophan in five human melanoma lines as well as  
34 primary human skin melanocytes and fibroblasts in response to IFN- $\gamma$ . In general,  
35 IFN- $\gamma$  affected kynurenine metabolism in stromal skin cells more than in melanoma  
36 cells, supporting a role of IFN- $\gamma$  in normal skin cell physiology and that of stromal  
37 cells in modulating the tumor microenvironment.  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

48  
49  
50 **Significance**

51 This study demonstrates, that IFN- $\gamma$  broadly modulates Trp metabolism in both,  
52 normal skin cells and melanoma cell lines. While IFN- $\gamma$  impacted KYN formation the  
53 strongest, other metabolites were also affected depending on the cell type.  
54 Interestingly, the effect of IFN- $\gamma$  was more prominent in stromal skin than tumor  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 cells. This finding seems especially relevant considering the recent description of  
4 IFN- $\gamma$  in pigmentation homeostasis. In addition, peri-tumoral Trp metabolism seems  
5 to be essential for tumor immune tolerance.  
6  
7  
8  
9  
10

11 Increased amino acid catabolism is essential for tumor growth and immune  
12 regulation in cancer (1,2). This is especially true for the kynurenine metabolites of  
13 tryptophan (**Fig. 1**), which exert diverse biological effects and have been investigated  
14 as markers of tumor progression and therapeutic effect (3). The kynurenine pathway  
15 has been associated mostly with immune tolerance and tumor escape mechanisms by  
16 the increased expression of its rate-limiting enzymes tryptophan 2,3-dioxygenase  
17 (TDO, 1.13.11.11) or the IFN- $\gamma$  inducible indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO,  
18 1.13.11.52)(4, 5). Both enzymes catalyze kynureneine (KYN) formation, which has  
19 been associated with malignancy and invasiveness of tumor cells, such as melanomas  
20 (6). The relevance of the other KP metabolites to tumour progression has been  
21 neglected for the most part (7).

22  
23 KYN is the substrate of three different enzymes: kynureinase (3.7.1.3),  
24 which produces anthranilic acid (AA); kynureneine oxo-glutarate transaminase  
25 (2.6.1.7), which produces kynurenic acid (KA), and kynureneine 3-monooxygenase  
26 (1.14.13.9), which produces 3-hydroxy-L-Kynureneine (HK). Both kynureneine oxo-  
27 glutarate transaminase (2.6.1.7) and kynureinase (3.7.1.3) can hydrolyze 3-hydroxy-  
28 L-kynureneine and produce xanthurenic acid (XA) and 3-hydroxyanthranilic acid  
29 (HAA), respectively. Alternatively, HAA can be synthesized by hydroxylation of AA  
30 by anthranilate 3-monooxygenase (1.14.16.3). HAA is converted by 3-  
31 hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase (1.13.11.6) to a semialdehyde that is rearranged  
32 to quinolinic acid (QA), or it is decarboxylated by aminocarboxymuconate-  
33 semialdehyde decarboxylase (4.1.1.45) generating picolinic acid (PA) (8). The last  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 steps of KP are related to the nicotinamide metabolism. In brief, QA can be used by  
4  
5 nicotinate-nucleotide diphosphorylase (2.4.2.19, also known as quinolinate  
6  
7 phosphoribosyltransferase) to synthesize nicotinate D-ribonucleotide, which is further  
8  
9 converted to NA by nicotinate phosphoribosyltransferase (6.3.4.21). Finally, NA can  
10  
11 be amidated by nicotinamidase (3.5.1.19) to generate NAM. All three metabolites,  
12  
13 QA, NA and NAM, can be used by human cells to synthesize NAD<sup>+</sup> (9).  
14  
15

16 To date, the entire KP has not been investigated yet in both primary skin and  
17  
18 melanoma cells. Here, we studied changes in abundance of KP intermediates in  
19  
20 response to IFN- $\gamma$  in five human melanoma lines as well as primary human skin  
21  
22 melanocytes and fibroblasts. Human metastatic melanoma cell lines (SK-Mel-19, SK-  
23  
24 Mel-29, SK-Mel-147, WM-1366 and UACC-62) and primary epidermal fibroblasts  
25  
26 were donated by M. Soengas (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas -  
27  
28 CNIO, Madrid, Spain). Human primary epidermal melanocytes were purchased from  
29  
30 ATCC (PCS-200-013; LGC Standards GmbH, Wesel, Germany). Primary fibroblasts  
31  
32 were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) (PAA Laboratories,  
33  
34 Pasching, Austria). Primary melanocytes were cultured in Dermal Cell Basal Media  
35  
36 (ATCC, PCS-200-030) supplemented with Melanocyte Growth Kit (ATTC, PCS-200-  
37  
38 042), penicillin (10 IU/mL), and streptomycin (10  $\mu$ g/mL). Melanoma cell lines were  
39  
40 cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (PAA  
41  
42 Laboratories). RPMI and DMEM were supplemented with 10% fetal bovine serum  
43  
44 (PAA Laboratories), penicillin (100 IU/mL), and streptomycin (100  $\mu$ g/mL). All cells  
45  
46 were maintained at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in 75 cm<sup>2</sup> bottles (Greiner Bio-  
47  
48 One, Kremsmünster, Austria). For the stimulation experiments, cells were seeded in  
49  
50 six-well plates (9.6 cm<sup>2</sup>/well, Greiner Bio-One) and cultured with the respective  
51  
52 medium for 24 h, before the media were exchanged for supplemented RPMI with or  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

without IFN- $\gamma$  (1000 IU/mL) (Imunik, Boehringer Ingelheim, Germany). After 24 h, tryptophan and its kynurenine metabolites were extracted from 100  $\mu$ L of cell culture supernatant by the addition of ice-cold methanol (400  $\mu$ L) and internal standard mix (10  $\mu$ L) at -20°C for 1 h following a previously published protocol (10). Extracts were then centrifuged at 10.000 x g for 10 min at 4°C and the supernatants collected and dried by vacuum evaporation (CombiDancer, Hettich AG, Bach, Switzerland). Prior to analysis, samples were reconstituted with 100  $\mu$ L of 0.1% formic acid in water and injected into an Agilent 1200 SL HPLC system coupled to a 4000 QTRAP® (AB Sciex, Framingham, MA, USA) mass spectrometer. The Student t-test, as implemented in the GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc.), was used to test the effect of IFN- $\gamma$  on kynurenine metabolism. To control for multiple testing, the Bonferroni correction was used to adjust the significance threshold to 0.000079 based on a total of n=63 comparisons made (Table 1).

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

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

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

1  
2  
3 IFN- $\gamma$  in melanosome maturation and, thus, pigmentation homeostasis (12). Further,  
4  
5 IFN- $\gamma$  has been implicated in the induction of UV light-mediated melanomagenesis,  
6  
7 possibly by creating immune tolerance to UV-transformed cells (13). Given our data  
8  
9 and the observation of peritumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression in  
10  
11 melanoma (14), it appears intriguing to speculate, that stromal cells in the tumor  
12  
13 microenvironment produce most of the KYN required for the immune escape of  
14  
15 melanoma cells (14).

16  
17 Kynurenic acid (KA) is also considered an immunosuppressive metabolite  
18  
19 associated with cancer invasiveness (15). It was consumed (dashed line in **Figure 2**)  
20  
21 corresponds to the concentration of KA measured in media without cells) by all cells  
22  
23 studied under basal conditions. IFN- $\gamma$ , however, caused SK-Mel-147 to secrete KA  
24  
25 and inhibited its consumption by UACC-62 and primary melanocytes, respectively.

26  
27 KYN can be hydroxylated to generate HK, which can then be converted to  
28  
29 either XA or HAA. In the present study, both normal skin cells and the melanoma cell  
30  
31 lines UACC-62 and SK-Mel-147 were able to synthesize HK under basal conditions.  
32  
33 Addition of IFN- $\gamma$  led to an increase in HK secretion in primary melanocytes only ( $p <$   
34  
35 0.002). It is known, that HK can suppress lymphocyte proliferation (T-CD4 $^{+}$ ) and  
36  
37 induce T-reg development (16). Consequently, synthesis and excretion of HK and  
38  
39 KYN by normal cells may be a major determinant of immune escape by melanoma  
40  
41 cells. Glycosylated HK is considered the major tryptophan-derived human lens UV  
42  
43 filter compound and it has the capability to absorb UVA light and cause the oxidation  
44  
45 of ascorbic acid (17). Interesting, IFN- $\gamma$  is related to pigmentation in skin damaged by  
46  
47 UV light (18). Together, these findings support a role for IFN- $\gamma$  in counteracting the  
48  
49 UV damage response by increasing Trp metabolism. If true, this mechanism is lost by  
50  
51 tumor cells. Although IFN- $\gamma$  did not change XA levels, melanocytes were the only  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 cells that totally consumed this metabolite from the culture media under basal  
4 conditions, suggesting a biological relevance of XA for normal melanocytes that has  
5 yet to be identified.  
6  
7

8  
9 Only melanocytes and SK-Mel-147 produced and excreted AA under basal  
10 conditions, while HAA was solely produced by Sk-Mel-19, WM-1366, and  
11 fibroblasts. IFN- $\gamma$  affected AA production similarly to that of KYN, while the  
12 synthesis of HAA was only upregulated in melanocytes ( $p = 0.0022$ ). Both molecules  
13 (AA and HAA) can autoxidize and generate mutagenic anthranilyl radical  
14 intermediates that, like KYN, can interact with the AhR receptor (19), which is  
15 among other functions responsible for melanogenesis regulation (20). The response  
16 mediated by IFN- $\gamma$  in increasing HAA in cultured melanocytes can also promote  
17 immune tolerance. It is known that HAA changes homeostatic proliferation of CD8+  
18 T cells (21) and it is presumably involved in the etiology of bladder cancer (22). On  
19 the other hand, HK and HAA can protect cells from peroxyl radical-mediated  
20 oxidative damage (23), thus representing a local antioxidant defense against UV light  
21 damage or tumor inflammation.  
22  
23

24 HAA can be converted to either picolinic acid or quinolinic acid (QA), which  
25 can be further metabolized to nicotinic acid (NA) and nicotinamide (NAM). The  
26 small amounts of QA present in the cell culture media were totally consumed by the  
27 primary melanocytes, and mostly by the melanoma cell line UACC-62. Interestingly,  
28 QA is an agonist of the NMDA receptor (24), necessary for melanocyte morphology  
29 maintenance (25). Of the remaining cell lines, SK-Mel-29 and WM-1366 neither  
30 consumed nor secreted QA, while SK-Mel-19, SK-Mel-147, and the primary  
31 fibroblasts secreted small amounts of QA. IFN- $\gamma$  did not affect QA abundance.  
32 Recently, QA synthesis was reported in microglia but not by glioma cells (26).  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

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

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

#### Acknowledgments

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

## References

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

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
17. Ortwerth BJ, Bhattacharyya J, Shipova E. Tryptophan metabolites from young human lenses and the photooxidation of ascorbic acid by UVA light. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(7):3311-9.
  18. Natarajan VT, Ganju P, Ramkumar A, Grover R, Gokhale RS. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. *Nature Chem Biol.* 2014;10(7):542-51.
  19. Chung K-T, Gadupudi GS. Possible roles of excess tryptophan metabolites in cancer. *Environ Mol Mut.* 2011;52(2):81-104.
  20. Luecke S, Backlund M, Jux B, Esser C, Krutmann J, Rannug A. The aryl hydrocarbon receptor (AHR), a novel regulator of human melanogenesis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010;23(6):828-33.
  21. Reschner A, Schumacher R, et al. Differential effects of the tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid on the proliferation of human CD8+ T cells induced by TCR triggering or homeostatic cytokines. *Eur J Immunol.* 2006;36(2):296-304.
  22. Teulings FA, Fokkens W, Kaalen J, van der Weff-Messing B. Concentration of free and conjugated 3-hydroxyanthranilic acid in urine of bladder tumor patients before and after therapy, measured with an enzymatic method. *Br J Cancer.* 1973;27(4):316-22.
  23. Christen S, Peterhans E, Stocker R. Antioxidant activities of some tryptophan - metabolites: possible implication for inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(7):2506-10.
  24. Stone TW, Perkins MN. Quinolinic acid - a potent endogenous excitant at amino-acid receptors in CNS. *Eur J Pharmacol.* 1981;72(4):411-2.
  25. Hoogduijn MJ, Hitchcock IS, Smit NPM, Gillbro JM, Schallreuter KU, Genever PG. Glutamate receptors on human melanocytes regulate the expression of MiTF. *Pigment Cell Research.* 2006;19(1):58-67.
  26. Sahm F, Oezen I, Opitz CA, Radlwimmer B, von Deimling A, Ahrendt T, et al. The Endogenous Tryptophan Metabolite and NAD<sup>+</sup> Precursor Quinolinic Acid Confers Resistance of Gliomas to Oxidative Stress. *Cancer Res.* 2013;73(11):3225-34.
  27. Dettmer K, Vogl FC, Ritter AP, Zhu W, Nuernberger N, Kreutz M, et al. Distinct metabolic differences between various human cancer and primary cells. *Electrophoresis.* 2013;34(19):2836-47.
  28. Chiarugi A, Dolle C, Felici R, Ziegler M. The NAD metabolome - a key determinant of cancer cell biology. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(11):741-52.

1  
2  
3 Legends of Figures  
4  
5  
6  
7  
8

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

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

For Peer Review

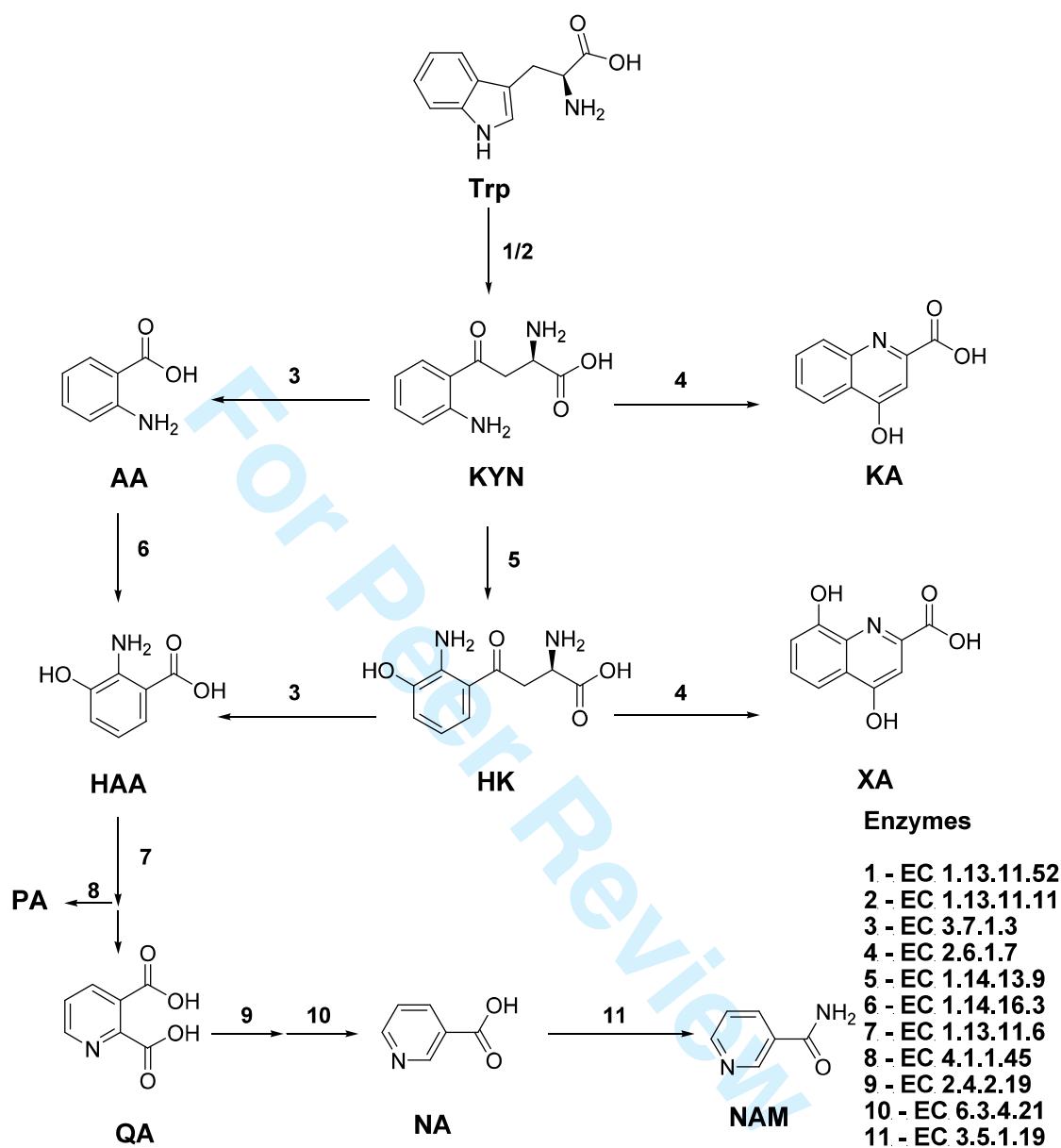


Figure 1

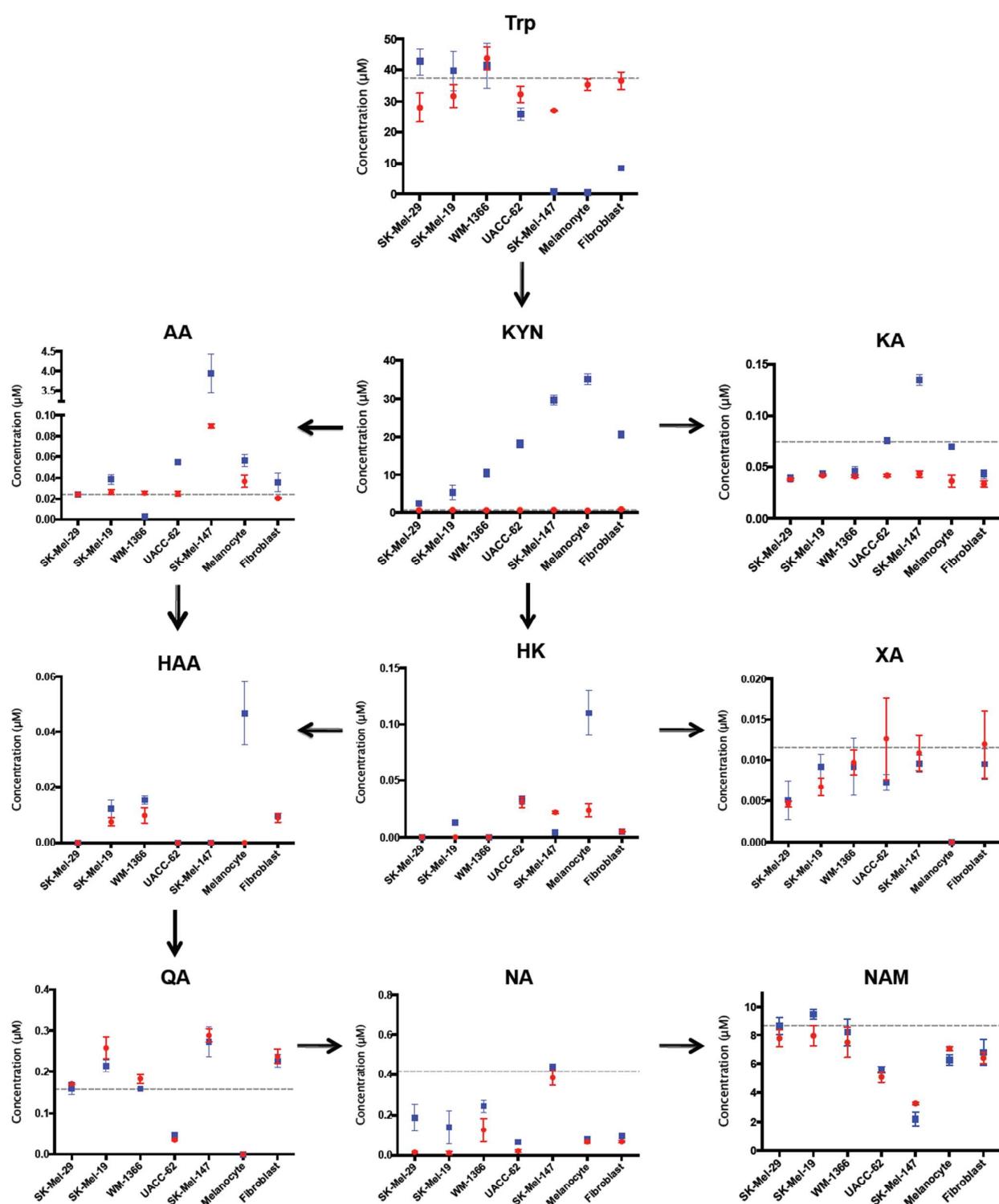


Figure 2.

1  
2  
3  
4  
5 **Table 1.** *p* values (Student's T-test corrected by Bonferroni method) for differences in  
6 supernatant concentration of KP metabolites between untreated and IFN- $\gamma$  treated transformed  
7 and non-transformed skin cells.  
8

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

19 \* Metabolites that could not be measured under either condition. In bold are the significant alterations  
20 (adjusted *p* value to 0,00079).  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

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

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

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

## Keywords

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

## Correspondence

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

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

doi:10.1111/febs.12444

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

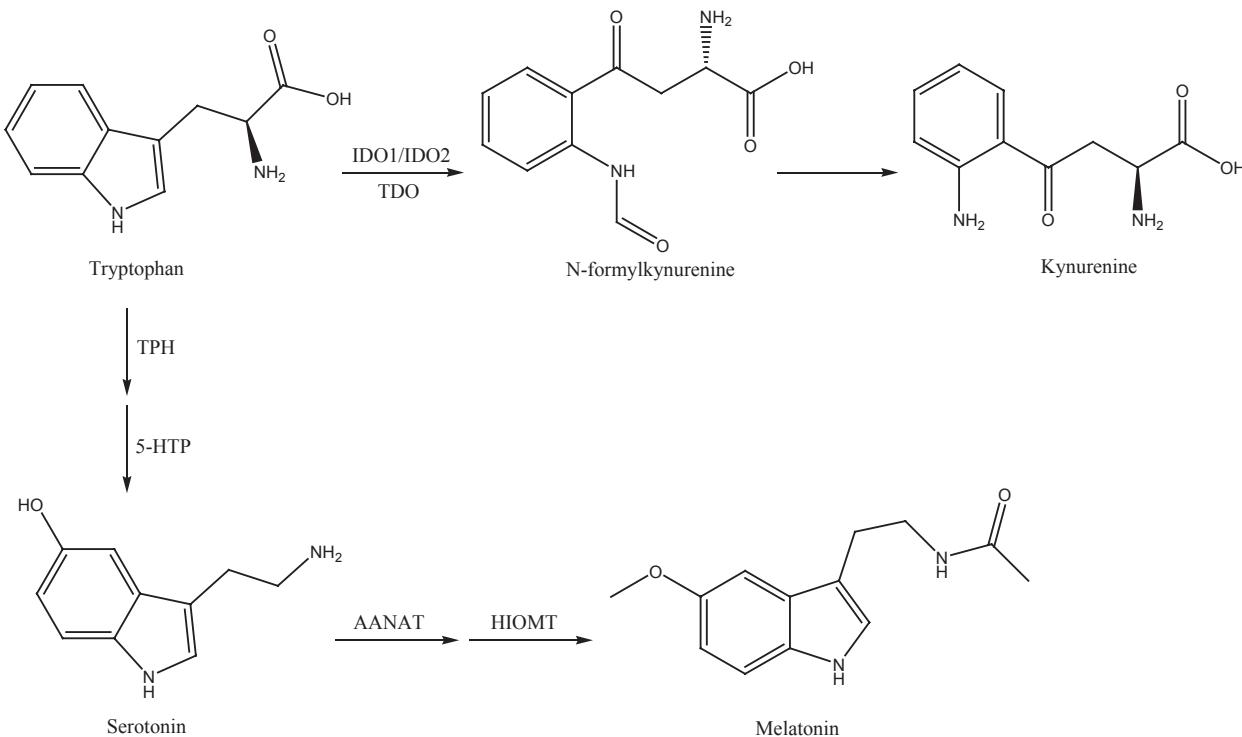
## Introduction

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

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

## Abbreviations

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



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

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

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

With regard to tumor biochemistry, there is a lack of information concerning the impact of 1-MT on other routes of Trp metabolism. Since the serotonin-

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

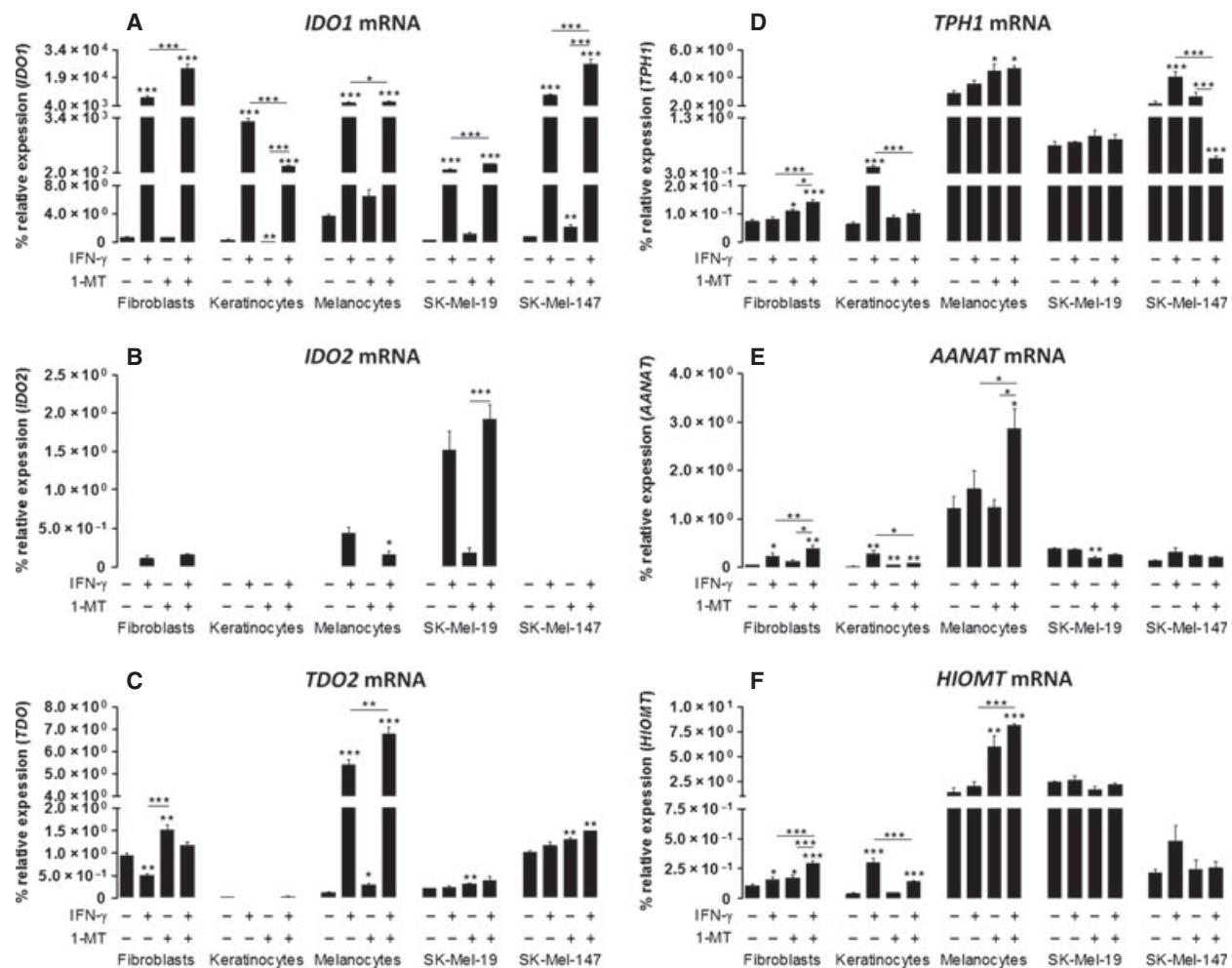
## Results

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

We evaluated the mRNA expression of Trp-metabolizing enzymes in cells that were treated with interferon- $\gamma$

(IFN- $\gamma$ ) and/or 1-MT. IFN- $\gamma$ , a classic IDO1 inducer [18], enabled the observation of 1-MT-mediated effects in cells with low basal *IDO1* expression. We observed heterogeneity in gene expression between different cell types. IFN- $\gamma$  produced a strong induction of *IDO1* mRNA in all skin cell types and melanoma cell lines. The contribution of other Kyn-producing enzymes appears to be minimal, because cells did not express or expressed comparatively much lower indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (*IDO2*) and tryptophan 2,3-dioxygenase 2 (*TDO2*) mRNA than *IDO1* mRNA (Fig. 2A, B,C). The results outlined above indicated that IDO1 is mainly responsible for Kyn production in skin cells and melanoma cells upon IFN- $\gamma$  treatment. Interestingly, among the skin cell types, fibroblasts demonstrated the greatest expression of *IDO1* mRNA after

IFN- $\gamma$  stimulation, as this expression was  $\sim$  2.5 and 1.5 times higher than that observed in keratinocytes and melanocytes, respectively (Fig. 2A). The induction of *IDO1* mRNA in fibroblasts was similar to that observed in SK-Mel-147 cells under the same stimulation conditions. Among the melanoma cell lines, SK-Mel-147 cells were more responsive to IFN- $\gamma$ -mediated upregulation of *IDO1* mRNA than SK-Mel-19 cells. With regard to the transcripts associated with serotonergic and melatoninergic pathways, there was a slight increase in the expression of *TPH1*, *AANAT* and *HIONMT* mRNA in keratinocytes treated with IFN- $\gamma$ , and increases in *TPH1* mRNA expression in treated SK-Mel-147 cells and *AANAT* and *HIONMT* mRNA expression in treated fibroblasts were also noted (Fig. 2D,E,F).



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

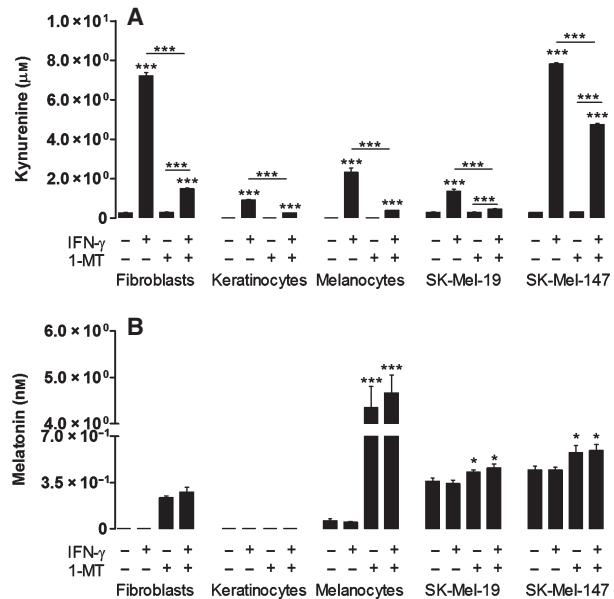
1-MT is a competitive inhibitor of IDO and is known to increase the expression of IDO in human cancer cells [19]. Upregulation of *IDO1* mRNA induced by 1-MT treatment was also observed in fibroblast, melanocyte and melanoma cells but not in keratinocytes (Fig. 2A). These results indicate that there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

In relation to the serotonergic and melatoninergic systems, melanocytes were very active and demonstrated the highest expression of *TPH1*, *AANAT* and *H1OMT* mRNA in comparison with the other cell types. Surprisingly, 1-MT induced the expression of *TPH1* and *H1OMT* mRNA in fibroblasts and melanocytes (Fig. 2D,E,F), indicating that due to the action of 1-MT these cells acquired the machinery necessary for the biosynthesis of melatonin.

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

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

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

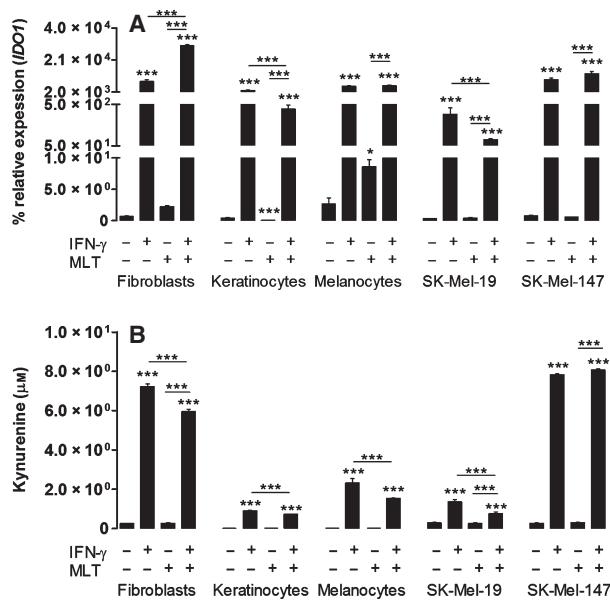


**Fig. 3.** 1-MT activates melatonin biosynthesis. (A) Quantification of Kyn production in the supernatants of fibroblast, keratinocyte, melanocyte and SK-Mel-19 and SK-Mel-147 cell cultures in response to 1-MT treatment, as assessed by HPLC analysis. (B) Quantification of melatonin levels in the supernatants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

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

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

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

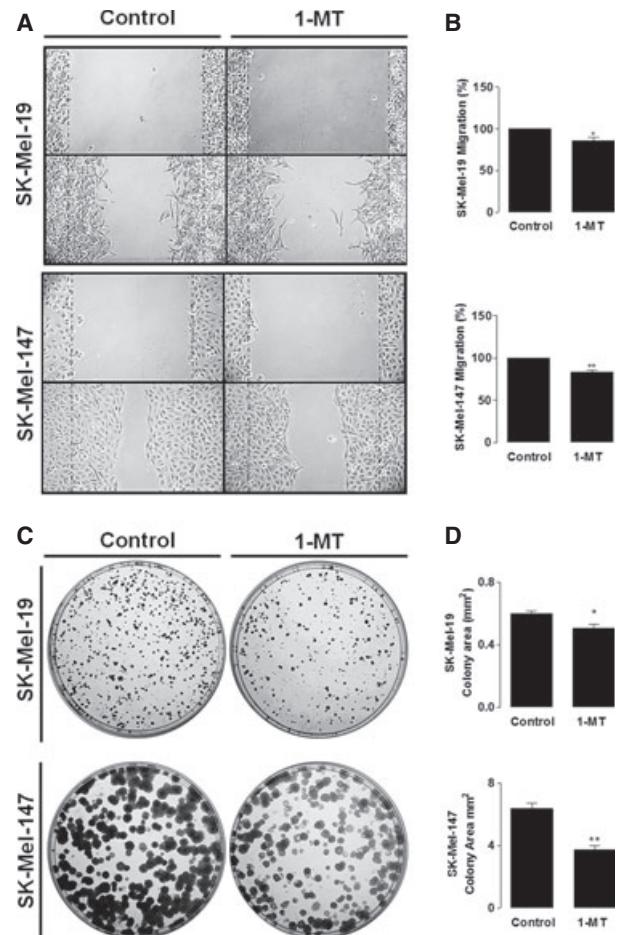


**Fig. 4.** Melatonin modulates Kyn production in skin cells and melanoma cell lines. (A) *IDO1* mRNA levels in fibroblasts, keratinocytes, melanocytes and SK-Mel-19 and SK-Mel-147 cells treated with melatonin. (B) Quantification of Kyn levels in cells by HPLC analysis after treatment with melatonin.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

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

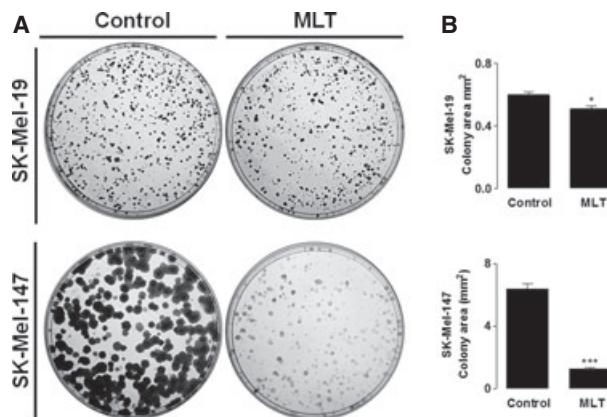
### 1-MT and melatonin treatment reduces the clonogenicity of melanoma cell lines

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



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

that observed for SK-Mel-19 cells (Fig. 5C,D), and this phenotype may have been due to the different genetic background of the two cell lines [23]. Notably, after 15 days of treatment with 1-MT, there was a 17% drop in the reproductive ability of SK-Mel-19 to form large colonies ( $0.600 \pm 0.016$  versus  $0.505 \pm 0.027$ , colony area in  $\text{mm}^2$ ,  $P = 0.02$ ). The strongest effect was observed in the SK-Mel-147 cell line, where cells had lost 42% of their reproductive integrity ( $6.36 \pm 0.36$  versus  $3.71 \pm 0.28$ , colony area



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

in  $\text{mm}^2$ ,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 5C,D). It is worth noting that the antiproliferative effect of 1-MT in the long-term colony formation could be observed for nine different melanoma cell lines (data not shown). These data suggest that treatment with 1-MT alone could affect melanoma migration and proliferation.

We next assessed the effects of melatonin on the proliferation of melanoma cells by performing the clonogenic assay. Melatonin treatment considerably reduced the size of the colonies that formed, demonstrating the existence of an inhibitory effect that was even greater than that induced by 1-MT. Remarkably, melatonin treatment decreased the reproductive integrity of SK-Mel-147 cells to form large colonies by 80% ( $6.36 \pm 0.36$  versus  $1.25 \pm 0.11$ , colony area in  $\text{mm}^2$ ,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 6A,B). In contrast, the effect on SK-Mel-19 cells was modest ( $0.600 \pm 0.016$  versus  $0.510 \pm 0.020$ , colony area in  $\text{mm}^2$ ,  $P = 0.01$ ), with an observed reduction in reproductive ability of 15%.

## Discussion

Despite the use of multiple new treatments in the form of either single agents or combinations, melanomas remain resistant to all therapies [24,25]. Due to the demand for newer strategies, the use of 1-MT has been considered as a therapeutic approach to improve T-cell-mediated tumor control [8,10]. This approach aims to disrupt tumor immune escape by inhibiting IDO, but 1-MT may also have off-target effects on

various biological features that contribute to tumor progression, which could be additionally exploited. Alternatively, we have provided the first evidence of melatonin biosynthesis driven by 1-MT in human skin cells and melanoma cell lines. We found that treatment with 1-MT or melatonin produced effects on tumor cell migration and proliferation, and our findings suggest additional effects of 1-MT as an adjuvant in the treatment of melanoma.

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

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

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

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

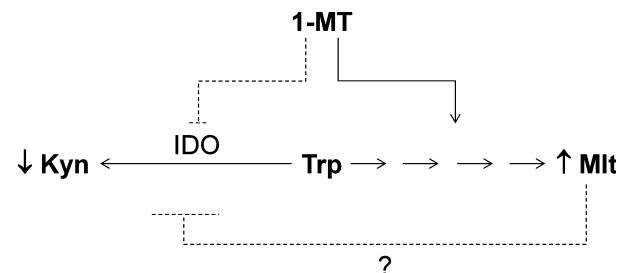
Persistent chemoresistance and immunoresistance as well as secondary toxicities compromise the response to cancer treatment [50]. Future studies should investigate whether concurrent adjuvant therapy in combination with modern chemotherapy could have an impact on patient survival outcomes. In fact, the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

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

## Materials and methods

### Cell culture conditions and treatments

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



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

co<sup>®</sup>), respectively, supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco<sup>®</sup>), penicillin (50 U·mL<sup>-1</sup>) and streptomycin (50 µg·mL<sup>-1</sup>). Keratinocytes were maintained in Epilife medium (SKU # M-EPICF-500, Cascade Biologics, Portland, OR, USA) supplemented with human keratinocyte growth supplement (SKU # S-001, Cascade Biologics). The melanocytes were maintained in 254CF medium (SKU # M-500-254CF, Cascade Biologics) supplemented with human melanocyte growth supplement (SKU # S-002-5, Cascade Biologics). All of the cells were maintained at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. To prepare the samples, cells were seeded in a six-well plate and cultured in the appropriate medium for 24 h until they were 60% confluent. Next, 1-MT (Sigma, St Louis, MO, USA) or melatonin (Sigma) was added to the cell culture for 24 h (1 mM final concentration) in the absence or presence of IFN-γ (1000 units·mL<sup>-1</sup>) (Peprotech, Ciudad de Mexico, DF, Mexico). The cellular supernatant was used for measuring the levels of Kyn and melatonin, and the adherent cells were harvested and used for RNA extraction. 1-MT and melatonin did not induce cell death under these conditions (data not shown).

### Real-time PCR

The total RNA was extracted using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Austin, TX, USA), according to the manufacturer's instructions. RNase-free DNase (Qiagen) was used to remove any potential contamination by genomic DNA. The samples were stored at -80 °C until needed. Up to 1 µg of total RNA was reverse transcribed using the High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, USA), according to the manufacturer's instructions. We performed real-time PCR using TaqMan fluorescence energy transfer assays with an ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The primers and fluorogenic probe used in this assay were obtained from Applied Biosystems, and they were ordered as Hs00266705\_g1 (*GAPDH*), Hs00986554\_m1 (*IDO1*), Hs01589373\_m1 (*IDO2*), Hs00194611\_m1 (*TDO2*), Hs01559141\_m1 (*TPH1*), Hs01063209\_g1 (*AANAT*) and Hs00946627\_m1 (*HIONMT*). For each of the real-time reactions, *GAPDH* was used as an endogenous housekeeping gene, and its expression did not vary according to IFN-γ, 1-MT or melatonin treatment. The relative comparison method (2<sup>-ΔΔCT</sup>) was used to compare the expression levels of mRNA.

### Kyn quantification

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

under a flow of nitrogen. The residue was dissolved in 150 µL MilliQ water and filtered using a spin-X<sup>®</sup> centrifuge tube filter (Corning<sup>®</sup> Costar<sup>®</sup>, Sigma). Next, 40 µL was injected into an HPLC Shimadzu SCL-10A vp system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Kynurenone was separated using a Luna C18 Phenomenex column (250 mm × 4.6 mm inner diameter column; 5 µm) with 100% acetonitrile (A) and milli-Q<sup>®</sup> H<sub>2</sub>O (B) as the mobile phases. The linear gradient began at A/B = 0/100 and ended at 22 min with A/B = 10/90. Next, the mobile phase was held at A/B = 0/100 for 5 min. During the entire chromatography procedure, the flow rate was set at 1 mL·min<sup>-1</sup>. The detection was performed using a Diode Array SPD-M10A Shimadzu detector by selecting a wavelength of 365 nm. The sample concentrations were calculated using standard curves. The amount of Kyn found in untreated cells corresponded to the amount of Kyn found in the supplemented medium (data not shown).

### Melatonin extraction and quantification

For melatonin extraction, the culture medium was separated and placed in a 15 mL Falcon tube containing 20 µL of 0.1 M NaOH and vortexed. Next, 100 µL of indole solution (100 µg·mL<sup>-1</sup>) was added as an internal standard, and the mixture was vortexed again. Then 2.5 mL of cold dichloromethane (stored at -20 °C) was added to the tube, which was vortexed continuously for 5 min and stored in an ice bath for another 5 min. Next, the tubes were centrifuged at 9.5 g for 10 min. The organic phase was transferred to a glass tube and dried under nitrogen gas flow. The samples were reconstituted by adding 150 µL of an acetonitrile-containing solution and 4 mM sodium formate (50 : 50 v/v), and the tubes were vortexed for 1 min. Next, 100 µL of this solution was transferred to a Spin-X centrifuge tube with a 22 µm filter (Costar, Corning) and centrifuged for 3 min at 1 g. Subsequently, 20 µL was injected into the equipment. Melatonin quantification was performed by liquid chromatography mass spectrometry using an ESI ion source, which was operated in a positive mode. The instrumentation consisted of LC 10Avp pumps, a SIL 10ADvp auto sampler, a SCL 10ADvp controller (all purchased from Shimadzu Co.) and a Quattro-Micro Triple Quadrupole (Micromass, Manchester, UK). The following source conditions were used for the equipment: 3.27 kV capillary, 15 V cone, 1 V extractor, 0.1 V rf lens, 100 °C source temperature, 300 °C desolvation temperature, 204 L·h<sup>-1</sup> cone gas flow, and 561 L·h<sup>-1</sup>. The desolvation gas flow and the analyzer equipment conditions were as follows: for 10 LM1 and HM1, a resolution of 0.2 V, ion energy 1, 37 entrance2, 12 collision energy, and 37 exit; and for 10 LM2 and HM2, a resolution of 2.0 V, ion energy 2, 850 V multiplier and 2.52 × 10<sup>-3</sup> mbar gas cell pressure. Each of these conditions was optimized by infusing a standard melatonin solution (1 µg·mL<sup>-1</sup>). The

analysis was performed using a MassLynx V4.0 data analysis system (Micromass, Cary, NC, USA), and the data were collected in SIR or MRM mode by selecting a transition of  $232.8(M + H) > m/z$  of 174 for melatonin and  $118(M + H) > m/z$  of 89 for the internal standard, with  $-12\text{ V}$  as the collision energy. Chromatography was performed under a gradient of 4 mM ammonium formate (pH 4, in MilliQ water, <sup>®</sup>Millipore) (referred to as buffer A) and 0.01% formic acid in acetonitrile (referred to as buffer B) at a flow rate of  $0.35\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A Kinetex C18 100A ( $50 \times 4.6\text{ mm}$ ,  $2.6\text{ }\mu\text{m}$ ; Phenomenex) column coupled to a KrudKatcher ultra column in-line filter (Phenomenex) was used. The elution gradients for column re-equilibration were as follows: 0–1 min, 50 A : 50 B, v/v; 1–4.5 min, 0 A : 100 B, v/v; 4.5–6.5 min, 0 A : 100 B, v/v; 6.5–7 min, 50 A : 50 B, v/v; and 7–9 min, 50 A : 50 B, v/v.

### Wound healing assay

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

### Clonogenic assay

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

### Statistics

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

### Acknowledgements

This work was supported by grants from the São Paulo Research Foundation – FAPESP (FAPESP

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

### References

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

- 10 Soliman H (2010) A Phase 1 Study of 1-Methyl-D-Tryptophan in Combination with Docetaxel in Metastatic Solid Tumors. No. NCT01191216.
- 11 Agaue S, Perrin-Cocon L, Coutant F, Andre P & Lotteau V (2006) 1-Methyl-tryptophan can interfere with TLR signaling in dendritic cells independently of IDO activity. *J Immunol* **177**, 2061–2071.
- 12 Slominski A, Pisarchik A, Semak I, Sweatman T, Wortsman J, Szczesniewski A, Slugocki G, McNulty J, Kausser S, Tobin DJ *et al.* (2002) Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. *FASEB J* **16**, 896–898.
- 13 Slominski A, Semak I, Pisarchik A, Sweatman T, Szczesniewski A & Wortsman J (2002) Conversion of L-tryptophan to serotonin and melatonin in human melanoma cells. *FEBS Lett* **511**, 102–106.
- 14 Slominski A, Pisarchik A, Zbytek B, Tobin DJ, Kausser S & Wortsman J (2003) Functional activity of serotonergic and melatonergic systems expressed in the skin. *J Cell Physiol* **196**, 144–153.
- 15 Slominski A, Tobin DJ, Zmijewski MA, Wortsman J & Paus R (2008) Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends Endocrinol Metab* **19**, 17–24.
- 16 Slominski A, Baker J, Rosano TG, Guisti LW, Ermak G, Grande M & Gaudet SJ (1996) Metabolism of serotonin to *N*-acetylserotonin, melatonin, and 5-methoxytryptamine in hamster skin culture. *J Biol Chem* **271**, 12281–12286.
- 17 Slominski A, Pisarchik A, Semak I, Sweatman T, Szczesniewski A & Wortsman J (2002) Serotonergic system in hamster skin. *J Invest Dermatol* **119**, 934–942.
- 18 Yoshida R, Imanishi J, Oku T, Kishida T & Hayaishi O (1981) Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 129–132.
- 19 Opitz CA, Litzenburger UM, Opitz U, Sahm F, Ochs K, Lutz C, Wick W & Platten M (2011) The indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibitor 1-methyl-D-tryptophan upregulates IDO1 in human cancer cells. *PLoS ONE* **6**, e19823.
- 20 Lob S, Konigsrainer A, Schafer R, Rammensee HG, Opelz G & Terness P (2008) Levo- but not dextro-1-methyl tryptophan abrogates the IDO activity of human dendritic cells. *Blood* **111**, 2152–2154.
- 21 Qian F, Villella J, Wallace PK, Mhawech-Fauceglia P, Tario JD, Andrews C, Matsuzaki J, Valmori D, Ayyoub M, Frederick PJ *et al.* (2009) Efficacy of levo-1-methyl tryptophan and dextro-1-methyl tryptophan in reversing indoleamine-2,3-dioxygenase-mediated arrest of T-cell proliferation in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* **69**, 5498–5504.
- 22 Sorensen RB, Kollgaard T, Andersen RS, van den Berg JH, Svane IM, Straten PT & Andersen MH (2011) Spontaneous cytotoxic T-cell reactivity against indoleamine 2,3-dioxygenase-2. *Cancer Res* **71**, 2038–2044.
- 23 Tormo D, Checinsk A, Alonso-Curbelo D, Perez-Guijarro E, Canon E, Riveiro-Falkenbach E, Calvo TG, Larribere L, Megias D, Mulero F *et al.* (2009) Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells. *Cancer Cell* **16**, 103–114.
- 24 Davar D & Kirkwood J (2012) New therapies in the treatment of melanoma. *Expert Opin Investig Drugs* **21**, 1643–1659.
- 25 Dummer R, Rozati S, Eggmann N, Rinderknech J & Goldinger SM (2012) From chemotherapy to targeted treatment. *Ann Oncol* **23**, x101–x103.
- 26 Opitz CA, Litzenburger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S, Schumacher T, Jestaedt L, Schrenk D, Welle M *et al.* (2011) An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* **478**, 197–203.
- 27 Pilote L, Larrieu P, Stroobant V, Colau D, Dolusic E, Frederick R, De Plaein E, Uyttenhove C, Wouters J, Masereel B *et al.* (2012) Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 2497–2502.
- 28 Sheipouri D, Braidy N & Guillemin GJ (2012) Kynurenone pathway in skin cells: implications for UV-induced skin damage. *Int J Tryptophan Res* **5**, 15–25.
- 29 Bahar MA, Nabai L & Ghahary A (2012) Immunoprotective role of indoleamine 2,3-dioxygenase in engraftment of allogenic skin substitute in wound healing. *J Burn Care Res* **33**, 364–370.
- 30 Mezrich JD, Fechner JH, Zhang XJ, Johnson BP, Burlingham WJ & Bradfield CA (2010) An interaction between kynurenone and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol* **185**, 3190–3198.
- 31 Bankoti J, Rase B, Simones T & Shepherd DM (2010) Functional and phenotypic effects of AhR activation in inflammatory dendritic cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **246**, 18–28.
- 32 Nguyen NT, Kimura A, Nakahama T, Chinen I, Masuda K, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y & Kishimoto T (2010) Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenone-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 19961–19966.
- 33 Cabrera J, Negrin G, Estevez F, Loro J, Reiter RJ & Quintana J (2010) Melatonin decreases cell proliferation and induces melanogenesis in human melanoma SK-MEL-1 cells. *J Pineal Res* **49**, 45–54.
- 34 Lissoni P, Brivio O, Brivio F, Barni S, Tancini G, Crippa D & Meregalli S (1996) Adjuvant therapy with the pineal hormone melatonin in patients with lymph node relapse due to malignant melanoma. *J Pineal Res* **21**, 239–242.

- 35 Mediavilla MD, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX, Manchester L & Reiter RJ (2010) Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr Med Chem* **17**, 4462–4481.
- 36 Lissoni P (2007) Biochemotherapy with standard chemotherapies plus the pineal hormone melatonin in the treatment of advanced solid neoplasms. *Pathol Biol* **55**, 201–204.
- 37 Lissoni P, Malugani F, Malysheva O, Kozlov V, Laudon M, Conti A & Maestroni G (2002) Neuroimmunotherapy of untreatable metastatic solid tumors with subcutaneous low-dose interleukin-2, melatonin and naltrexone: modulation of interleukin-2-induced antitumor immunity by blocking the opioid system. *Neuro Endocrinol Lett* **23**, 341–344.
- 38 Lissoni P, Vaghi M, Ardizzoia A, Malugani F, Fumagalli E, Bordin V, Fumagalli L, Bordoni A, Mengo S, Gardani GS *et al.* (2002) A phase II study of chemoneuroimmunotherapy with platinum, subcutaneous low-dose interleukin-2 and the pineal neurohormone melatonin (P.I.M.) as a second-line therapy in metastatic melanoma patients progressing on dacarbazine plus interferon-alpha. *In Vivo* **16**, 93–96.
- 39 Slominski A & Pruski D (1993) Melatonin inhibits proliferation and melanogenesis in rodent melanoma cells. *Exp Cell Res* **206**, 189–194.
- 40 Fischer TW, Zmijewski MA, Zbytek B, Sweatman TW, Slominski RM, Wortsman J & Slominski A (2006) Oncostatic effects of the indole melatonin and expression of its cytosolic and nuclear receptors in cultured human melanoma cell lines. *Int J Oncol* **29**, 665–672.
- 41 Souza AV, Visconti MA & Castrucci AM (2003) Melatonin biological activity and binding sites in human melanoma cells. *J Pineal Res* **34**, 242–248.
- 42 Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS & Slominski AT (2012) Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol* **351**, 152–166.
- 43 Ferry G, Ubeaud C, Lambert PH, Bertin S, Cogé F, Chomarat P, Delagrange P, Serkiz B, Bouchet JP, Truscott RJ *et al.* (2005) Molecular evidence that melatonin is enzymatically oxidized in a different manner than tryptophan: investigations with both indoleamine 2,3-dioxygenase and myeloperoxidase. *Biochem J* **388**, 205–215.
- 44 Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J & D'Arpa D (1999) Melatonin and tryptophan derivatives as free radical scavengers and antioxidants. *Adv Exp Med Bio* **467**, 379–387.
- 45 Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J, D'Arpa D, Sainz RM, Mayo JC & Ramos S (1999) The oxidant/antioxidant network: role of melatonin. *Biol Signals Recept* **8**, 56–63.
- 46 Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M & Calvo JR (2000) Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol Signals Recept* **9**, 137–159.
- 47 Werner ER & Werner-Felmayer G (2007) Substrate and cofactor requirements of indoleamine 2,3-dioxygenase in interferon-gamma-treated cells: utilization of oxygen rather than superoxide. *Curr Drug Metab* **8**, 201–203.
- 48 Sono M, Taniguchi T, Watanabe Y & Hayaishi O (1980) Indoleamine 2,3-dioxygenase. Equilibrium studies of the tryptophan binding to the ferric, ferrous, and CO-bound enzymes. *J Biol Chem* **255**, 1339–1345.
- 49 Hayaishi O, Rothberg S, Mehler AH & Saito Y (1957) Studies on oxygenases; enzymatic formation of kynurenone from tryptophan. *J Biol Chem* **229**, 889–896.
- 50 Muller AJ & Prendergast GC (2005) Marrying immunotherapy with chemotherapy: why say IDO? *Cancer Res* **65**, 8065–8068.
- 51 Balachandran VP, Cavnar MJ, Zeng S, Bamboat ZM, Ocuin LM, Obaid H, Sorenson EC, Popow R, Ariyan C, Rossi F *et al.* (2011) Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of IDO. *Nat Med* **17**, 1094–1100.
- 52 Brohem CA, Massaro RR, Tiago M, Marinho CE, Jasiilionis MG, de Almeida RL, Rivelli DP, Albuquerque RC, de Oliveira TF, de Melo Loureiro AP *et al.* (2012) Proteasome inhibition and ROS generation by 4-nerolidylcatechol induces melanoma cell death. *Pigment Cell Melanoma Res* **25**, 354–369.



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

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

<sup>a</sup> Department of Clinical Chemistry and Toxicology, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Department of Psychobiology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Department of Fundamental Chemistry, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 December 2013

Received in revised form 23 January 2014

Accepted 24 January 2014

Available online 6 February 2014

#### Keywords:

*N,N*-dimethyltryptamine (DMT)

Horseradish peroxidase (HRP)

Melanoma

Myeloperoxidase (MPO)

Tryptamine

### ABSTRACT

Tryptophan (TRP) is essential for many physiological processes, and its metabolism changes in some diseases such as infection and cancer. The most studied aspects of TRP metabolism are the kynurenine and serotonin pathways. A minor metabolic route, tryptamine and *N,N*-dimethyltryptamine (DMT) biosynthesis, has received far less attention, probably because of the very low amounts of these compounds detected only in some tissues, which has led them to be collectively considered as trace amines. In a previous study, we showed a metabolic interrelationship for TRP in melanoma cell lines. Here, we identified DMT and *N,N*-dimethyl-N-formyl-kynuramine (DMFK) in the supernatant of cultured SK-Mel-147 cells. Furthermore, when we added DMT to the cell culture, we found hydroxy-DMT (OH-DMT) and indole acetic acid (IAA) in the cell supernatant at 24 h. We found that SK-Mel-147 cells expressed mRNA for myeloperoxidase (MPO) and also had peroxidase activity. We further found that DMT oxidation was catalyzed by peroxidases. DMT oxidation by horseradish peroxidase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MPO from PMA-activated neutrophils produced DMFK, *N,N*-dimethyl-kynuramine (DMK) and OH-DMT. Oxidation of DMT by peroxidases apparently uses the common peroxidase cycle involving the native enzyme, compound I and compound II. In conclusion, this study describes a possible alternative metabolic pathway for DMT involving peroxidases that has not previously been described in humans and identifies DMT and metabolites in a melanoma cell line. The extension of these findings to other cell types and the biological effects of DMT and its metabolites on cell proliferation and function are key questions for future studies.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

When not used for protein synthesis, the essential amino acid tryptophan (TRP) is mainly degraded (95%) through the kynurenine (KYN) pathway [1,2]. The first and rate-limiting step of this biochemical process is catalyzed by two dioxygenases: tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) [3]. The incorporation of two atoms of oxygen into the TRP indole ring and the cleavage of this ring generates the indole ring-opening product *N*-formyl-kynurene that is then deacetylated to KYN (Fig. 1A).

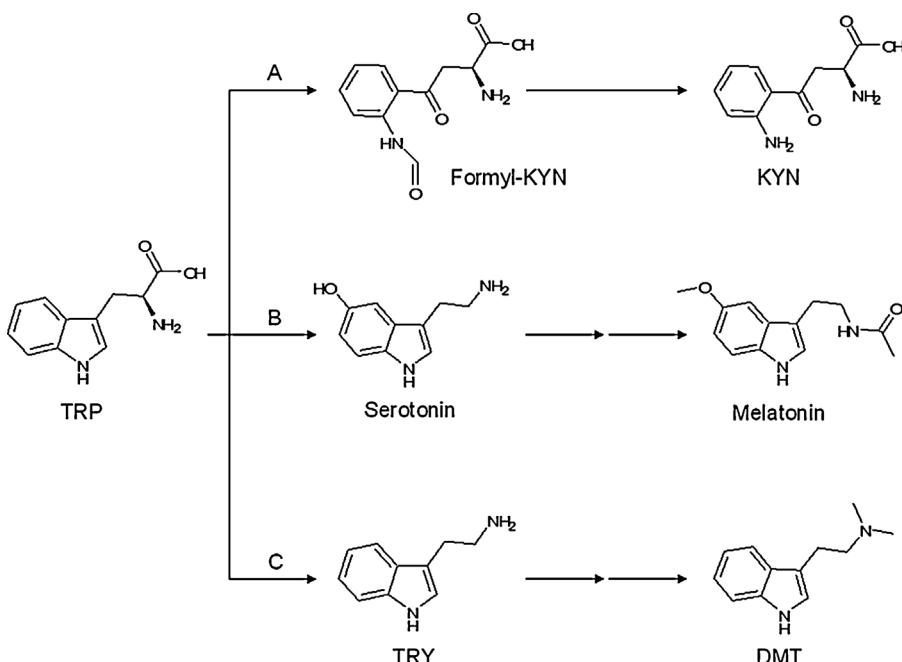
Another well-studied route for TRP metabolism is the serotonin pathway, which is responsible for approximately 4% of TRP metabolism [4]. Some tissues such as the pineal gland produce the hormone melatonin from serotonin [5] (Fig. 1B). Although the KYN and serotonin routes account together for almost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

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

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

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

<sup>1</sup> These authors equally contributed to this study.



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

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

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

Furthermore, peroxidases are not specific and act on different indolic compounds, leading to products that have an indole opening ring mark analogous to KYN. For example, melatonin metabolism by MPO forms N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxy-kynuramine (AFMK) and the demethylated form N1-acetyl-5-methoxy-kynuramine (AMK) (Fig. 2) [15,16]. The biological relevance of KYN and KYN-like compounds is clear; KYN is a pivotal molecule for immune escape by tumors with resulting tolerance [17], and AFMK and AMK have shown several immunomodulatory effects [18,19].

Based on the information above and on the preliminary finding that SK-Mel-147 produced DMT, we studied DMT metabolism

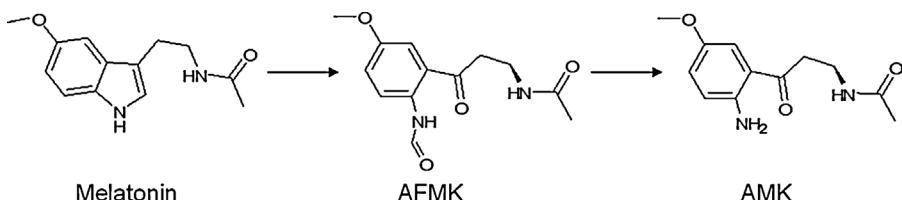
by peroxidases, including MPO, that are present in neutrophils, and decided to search for possible DMT metabolites, including indole ring-opened molecules, that could be associated with the presence of peroxidases in the SK-Mel-147 melanoma line.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and solutions

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

Stock solutions of PMA were prepared in DMSO (100 µM) and stored at –20 °C. Phosphate-buffered saline (PBS) solution (10 mM, pH 7.4) was prepared using 10 mM KCl and 140 mM NaCl. In experiments with neutrophils, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1.0 mg/mL D-glucose were added to PBS (this complete buffer is referred to as Buffer A).



**Fig. 2.** Melatonin oxidation to indole ring-opening products. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxy-kynuramine (AFMK); N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK).

## 2.2. Synthesis and purification of DMT

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

## 2.3. Melanoma cell line SK-Mel-147 culture

The melanoma cell line SK-Mel-147 was grown in DMEM high-glucose medium supplemented with 10% FBS and penicillin (50 U/mL) – streptomycin (50 µg/mL) and maintained at 37 °C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells were plated on 6-well plates and grown for 24 h until they reached 80% confluence.

## 2.4. Identification of DMT and its metabolites in SK-Mel-147 by LC-MS/MS

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

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

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

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

Total RNA was extracted from cells using an RNeasy Mini kit (Qiagen). Contaminating genomic DNA was removed using the RNase-free DNase Data Set (Qiagen). Up to 1 µg of total RNA was reverse transcribed using the High-capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems). Real-time PCR was performed using the TaqMan fluorescence energy transfer assay on an ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The primers and fluorogenic probe were from Applied Biosystems [codes Hs00266705\_g1 (GAPDH) and Hs00924295\_m1 (MPO)]. The

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

Peroxidase activity was estimated in a microplate luminometer (LB96V – EG&G Berthold). Luminol (1.0 mM) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mM) in PBS pH 7.4 were added to cell homogenates prepared from 1 × 10<sup>6</sup> cells at 37 °C.

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

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

## 2.7. Oxidation of DMT by HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system

DMT (0.1 mM) was incubated with 1.0 µM HRP and 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS (pH 7.4) in a final volume of 300 µL under agitation (850 rpm) in a thermomixer (Eppendorf, Edison, NJ, USA) with light protection at 37 °C. The reaction was stopped after 60 min by adding 300 µL of ice-cold acetonitrile. The sample was centrifuged at 9600 × g for 5 min, and 20 µL of the supernatant was analyzed by LC-UV-ESI-MS.

## 2.8. Isolation of human neutrophils

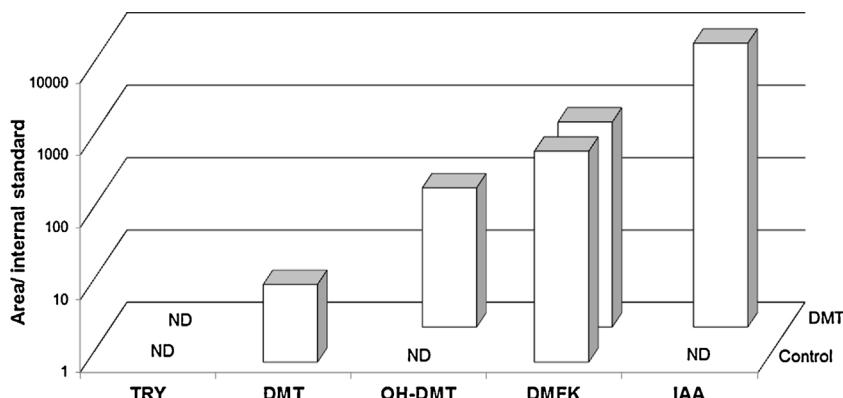
Purified neutrophils (98%) were obtained from healthy blood donors by Histopaque®-1077 centrifugation, dextran sedimentation, and hypotonic lysis of red blood cells [22]. After isolation, neutrophils were resuspended in 1.0 mL of Buffer A, and cell density was determined in a Neubauer improved bright-line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

## 2.9. Oxidation of DMT by activated neutrophils

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

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

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



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

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

#### 2.11. Statistics

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

### 3. Results

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

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

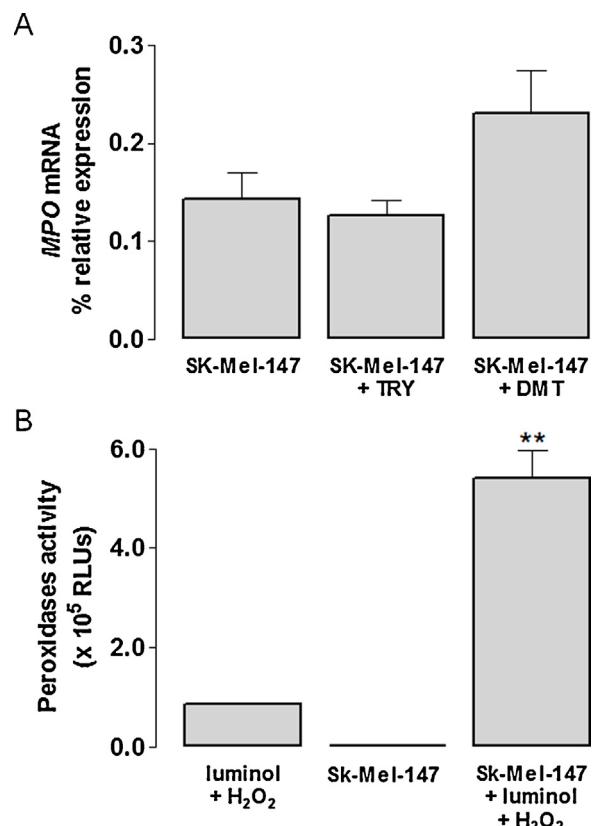
#### 3.2. Peroxidase activity of SK-Mel-147

Although it was previously thought that MPO was exclusive to phagocytes, it is currently recognized that other cell types express it [24,25]. Because DMFK was detected in SK-Mel-147 cells, we investigated MPO mRNA expression. SK-Mel-147 cells expressed MPO mRNA as shown by qPCR, and the levels of expression were not changed by the addition of TRY or DMT (Fig. 4A). We estimated the peroxidase activity in SK-Mel-147 cells by the luminol-chemiluminescent assay (Fig. 4B), as peroxidases catalyze the chemiluminescent oxidation of luminol by  $H_2O_2$  [26]. The higher

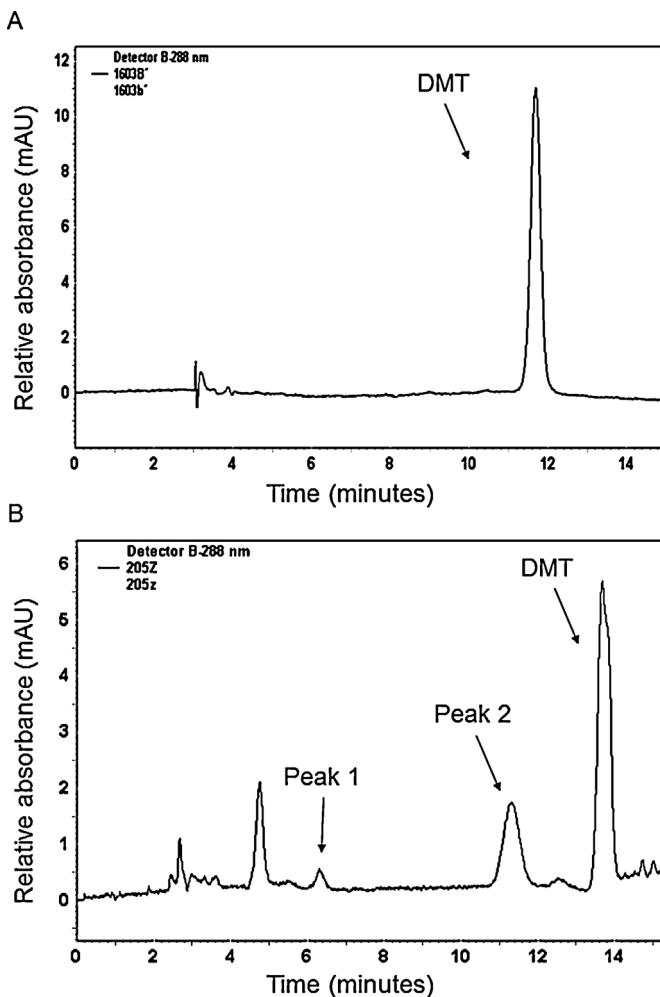
level of light was in the presence of SK-Mel-147 cell homogenates than in the control reactions indicates the presence of an active peroxidase in this cell type.

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

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



**Fig. 4.** MPO mRNA expression and peroxidase activity in SK-Mel-147 cells. (A) MPO mRNA was expressed in SK-Mel-147 cells, and its expression was not modified by the addition of 100  $\mu$ M TRY or DMT in cell culture. (B) Peroxidase activity was measured in the SK-Mel-147 cell homogenate ( $1.0 \times 10^6$  cells) in the presence of luminol (1.0 mM) and  $H_2O_2$  (0.5 mM). Data are shown as relative luminescence units (RLU). The error bars correspond to the SEM from three independent experiments. \*\* indicates  $P < 0.01$ .



**Fig. 5.** HPLC analysis of DMT oxidation by HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. DMT (0.1 mM) was incubated with HRP (1.0  $\mu$ M) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mM). UV chromatogram of DMT at 288 nm (A) at time zero; and (B) after 15 min of reaction when it was stopped by addition of one volume (300  $\mu$ L) of ice-cold acetonitrile.

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

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

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

and psilocin (4-OH-DMT) [29]. Because in our experiment it was not possible to identify the real position of the hydroxyl group on the aromatic ring, it was generically named OH-DMT. MS/MS analyses of ion *m/z* 221 showed a neutral loss of dimethylamine (C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>N) and dimethylethylamine (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>N), and the *m/z* 193 ion (loss of CO) was also detected. This result suggests that this compound was an indole ring-opened DMT, designated here as DMFK (Fig. 6B). The *m/z* 193 ion showed the same neutral loss of DMT, OH-DMT and DMFK, and the spectrum indicated the presence of the deformed form of DMFK, DMK (Fig. 6C). The elemental composition of these three DMT metabolites were confirmed by high-resolution mass spectrometry (Micro TOF) by direct injection after HPLC separation (Fig. 7A and B).

#### 3.4. Reaction of DMT with activated neutrophils

Neutrophils have two important features that characterize them as a good biochemical system for peroxidase-catalyzed reactions. When activated, neutrophils organize the NADPH oxidase system to ensure an adequate supply of superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [30,31]. Furthermore, they are the cells with the highest level of MPO [32]. Neutrophils can be activated by physiological and non-physiological stimuli. Here, we used the non-physiological stimulus phorbol myristate acetate (PMA). Similar to what was observed in the presence of HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PMA-activated neutrophils oxidized DMT to OH-DMT, DMFK and DMK. Because of the relatively low yield of the reaction, the products were analyzed only by iontrap mass spectrometry and confirmed by high resolution MicroTOF (Fig. 5). The kinetics of DMT consumption and the products formed are presented in Fig. 8.

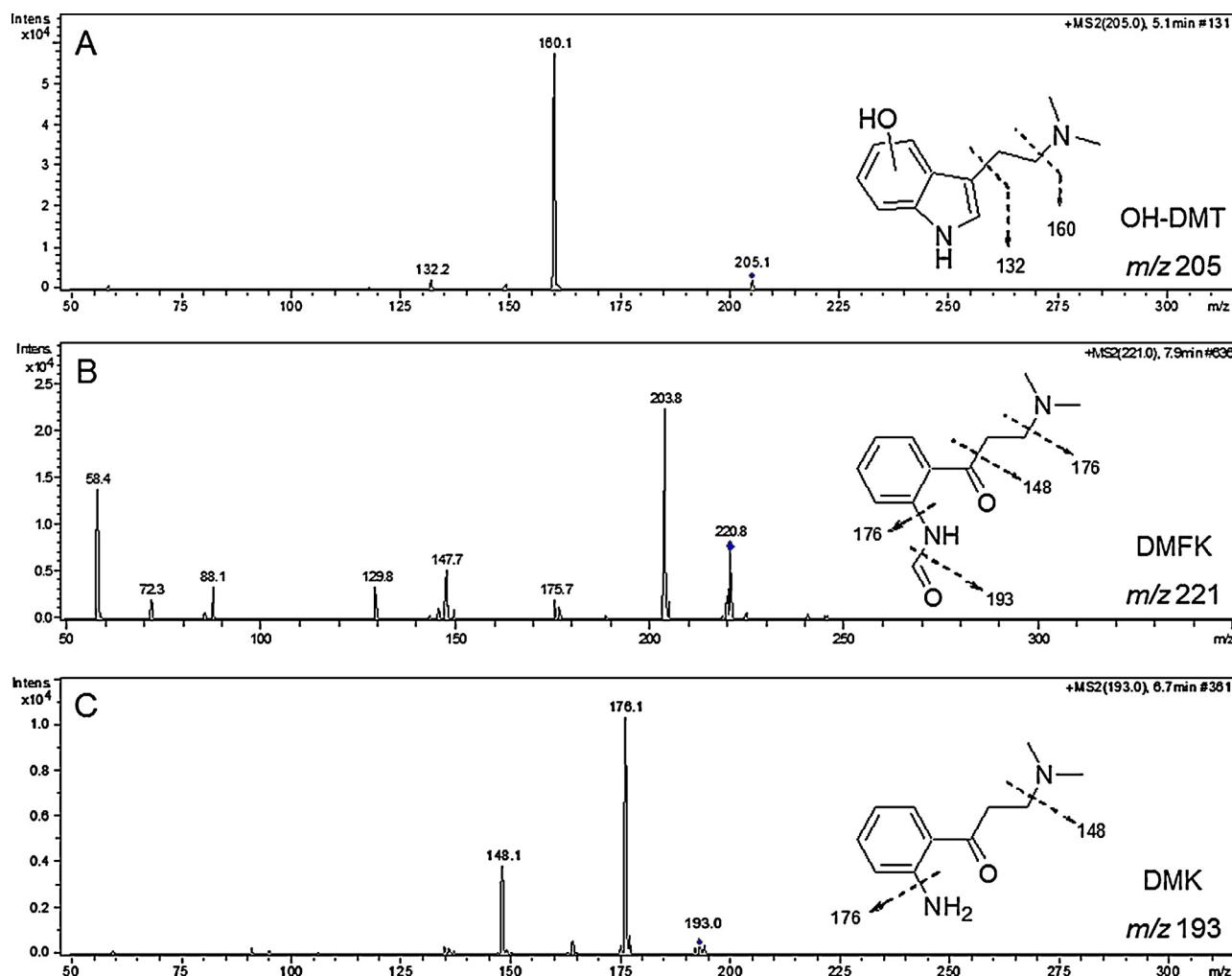
As in previous studies on the oxidation of melatonin [15] and lysergic acid diethylamide [33] by activated neutrophils, various inhibitors were added to neutrophils to establish the mechanism by which the cells form DMFK and OH-DMT (Fig. 9). The production of DMFK and OH-DMT was almost abolished when NADPH oxidase was inhibited by diphenyliodonium (DPI), showing that superoxide and/or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> must be produced by neutrophils before they can oxidize DMT. Azide, an inhibitor of MPO, profoundly affected DMFK and OH-DMT production, thus emphasizing the need for an active peroxidase to oxidize DMT.

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

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

#### 4. Discussion

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



**Fig. 6.** Fragmentation spectra (MS/MS) of the metabolites of the DMT/HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaction. (A) *m/z* 205 ion (OH-DMT), (B) *m/z* 221 ion (DMFK) and (C) *m/z* 193 ion (DMK). The ESI was operated in positive mode.

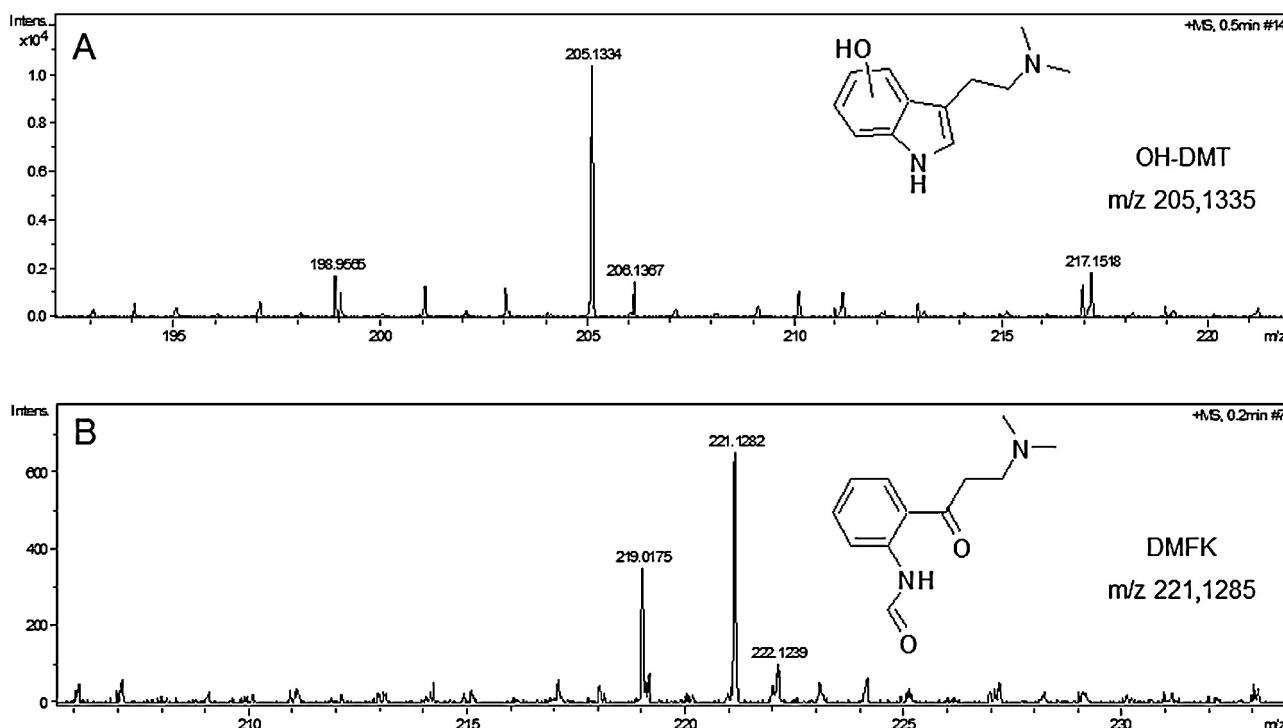
and DMK were found as DMT metabolites in peroxidase-catalyzed reactions, suggesting a role for peroxidases or peroxidase-like enzyme activities in DMT metabolism. Furthermore, we detected DMT and DMFK in the supernatant of a melanoma cell line. The significance of this finding is not yet known, but it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

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

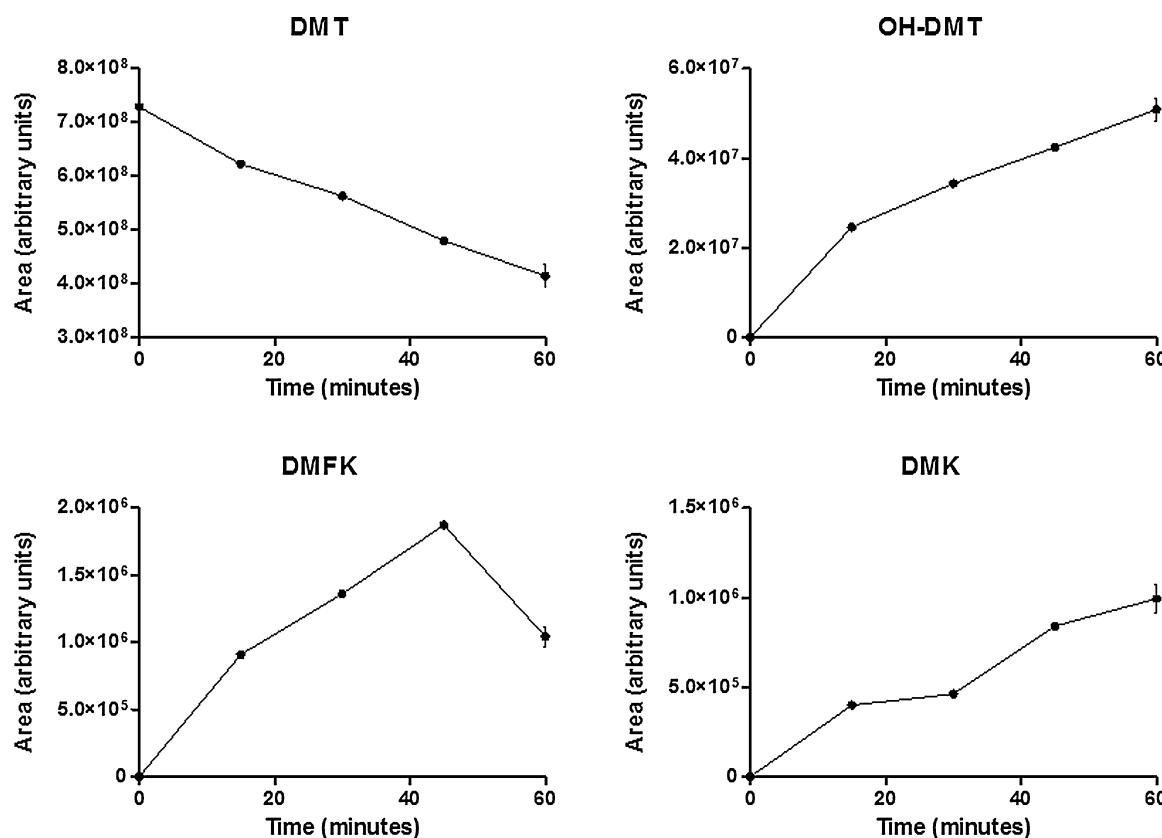
conditions suggests that DMFK may be a central DMT metabolite, at least for some cell types.

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

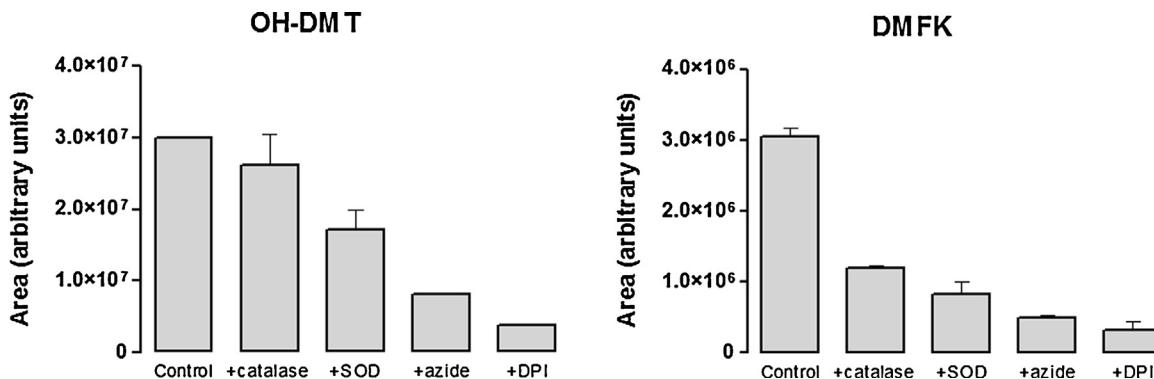
Chemically, the metabolic pathway described here is similar to that described for other natural indolic compounds such as MLT [15], TRP [48] and SER [49], and for the hallucinogen lysergic acid diethylamide [33]. The common characteristic of the peroxidase-catalyzed oxidation of these indolic compounds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



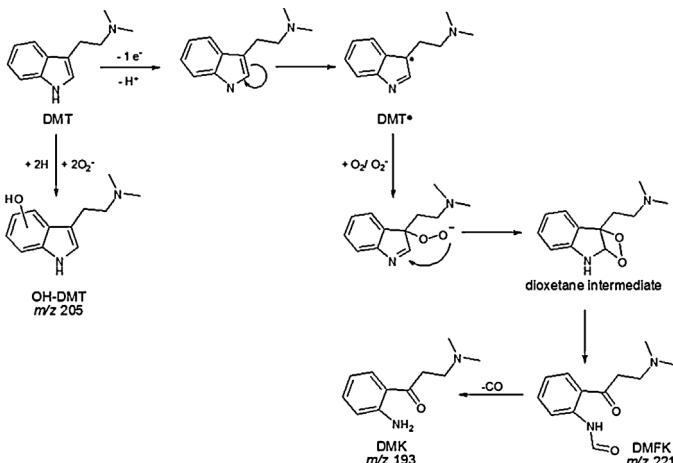
**Fig. 7.** Mass spectra (micro TOF) of the metabolites of the DMT/HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaction. (A) m/z 205 ion (OH-DMT) and (B) m/z 221 ion (DMFK). The ESI was operated in positive mode. Relative error in the micro TOF analysis was below 2 ppm.



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



**Fig. 9.** Effects of reactive oxygen species scavengers on OH-DMT and DMFK produced from DMT by PMA-activated neutrophils. Catalase (10 µg/assay), azide (1.0 mM), SOD (10 µg/assay) and DPI (20 µM/assay) were added to PMA ( $50 \text{ ng/ml}$ )-activated neutrophils ( $2.0 \times 10^6 \text{ cells/assay}$ ) in the presence of DMT (0.1 mM). The OH-DMT and DMFK metabolites were analyzed by LC-MS/MS. The data represent the integrated area of the peaks after a 15-min reaction and are presented as the mean  $\pm$  SD of five experiments.



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

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

## Acknowledgments

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

## References

- [1] Peters JC. Tryptophan nutrition and metabolism – an overview. *Adv Exp Med Biol* 1991;294:345–58.
- [2] King NJ, Thomas SR. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:2167–72.
- [3] Brody JR, Costantino CL, Berger AC, Sato T, Lisanti MP, Yeo CJ, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival. *Cell Cycle* 2009;8:1930–4.
- [4] Nordlind K, Azmitia EC, Slominski A. The skin as a mirror of the soul: exploring the possible roles of serotonin. *Exp Dermatol* 2008;17:301–11.
- [5] Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia* 1989;45:922–32.
- [6] Jacob MS, Presti DE. Endogenous psychoactive tryptamines reconsidered: an anxiolytic role for dimethyltryptamine. *Med Hypotheses* 2005;64:930–7.
- [7] Franzen FR, Gross H, Tryptamine. N,N-dimethyltryptamine, N,N-dimethyl-5-hydroxytryptamine and 5-methoxytryptamine in human blood and urine. *Nature* 1965;206:1052–.
- [8] Lipinski JF, Mandel LR, Ahn HS, Vandenheuvel WJA, Walker RW. Blood dimethyltryptamine concentrations in psychotic disorders. *Biol Psychiatry* 1974;9:89–91.
- [9] Oon MC, Murray RM, Rodnight R, Murphy MP, Birley JL. Factors affecting the urinary excretion of endogenously formed dimethyltryptamine in normal human subjects. *Psychopharmacology (Berl)* 1977;54:171–5.
- [10] Karkkainen J, Forstrom T, Tornaeus J, Wahala K, Kiuru P, Honkanen A, et al. Potentially hallucinogenic 5-hydroxytryptamine receptor ligands bufotenine and dimethyltryptamine in blood and tissues. *Scand J Clin Lab Invest* 2005;65:189–99.
- [11] Axelrod J. Enzymatic formation psychotomimetic metabolites from normally occurring compounds. *Science* 1961;134:343.
- [12] Szara S. Dimethyltryptamine: its metabolism in man; the relation to its psychotic effect to the serotonin metabolism. *Experientia* 1956;12:441–2.
- [13] Kaplan J, Mandel LR, Stillman R, Walker RW, VandenHeuvel WJ, Gillin JC, et al. Blood and urine levels of N,N-dimethyltryptamine following administration of psychoactive dosages to human subjects. *Psychopharmacologia* 1974;38:239–45.
- [14] Tourino MC, de Oliveira EM, Belle LP, Knebel FH, Albuquerque RC, Dorr FA, et al. Tryptamine and dimethyltryptamine inhibit indoleamine 2,3 dioxygenase and increase the tumor-reactive effect of peripheral blood mononuclear cells. *Cell Biochem Funct* 2013;31:361–4.
- [15] Silva SO, Ximenes VF, Catalani LH, Campa A. Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of melatonin by activated neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:657–62.
- [16] Ximenes VF, Silva SO, Rodrigues MR, Catalani LH, Maghzal GJ, Kettle AJ, et al. Superoxide-dependent oxidation of melatonin by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2005;280:38160–69.
- [17] Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest* 2007;117:1147–54.
- [18] Silva SO, Carvalho SR, Ximenes VF, Okada SS, Campa A. Melatonin and its kynurenine-like oxidation products affect the microbicidal activity of neutrophils. *Microbes Infect* 2006;8:420–5.
- [19] Silva SO, Ximenes VF, Livramento JA, Catalani LH, Campa A. High concentrations of the melatonin metabolite, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, in cerebrospinal fluid of patients with meningitis: a possible immunomodulatory mechanism. *J Pineal Res* 2005;39:302–6.
- [20] Joan B, Tomàs R, Montserrat A, Dolors F-F. Synthesis of 5-(sulfamoylmethyl)-1-indoles. *Tetrahedron* 2001;57:1041–8.
- [21] Powers JC. The mass spectrometry of simple indoles. *J Org Chem* 1968;35: 2044–50.
- [22] Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;97:77–89.
- [23] Moreno AC, Clara RO, Coimbra JB, Julio AR, Albuquerque RC, Oliveira EM, et al. The expanding roles of 1-methyl-tryptophan (1-MT): in addition to inhibiting kynureine production, 1-MT activates the synthesis of melatonin in skin cells. *FEBS J* 2013;280:4782–92.
- [24] Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. Microglia and myeloperoxidase: a deadly partnership in neurodegenerative disease. *Free Radic Biol Med* 2008;45:726–31.
- [25] Saed MG, Jiang Z, Diamond MP, Abu-Soud HM. The role of myeloperoxidase in the pathogenesis of postoperative adhesions. *Wound Repair Regen: Off Publ Wound Heal Soc [and] Eur Tissue Repair Soc* 2009;17:531–9.
- [26] Hastings JW, Wilson T. Bioluminescence and chemiluminescence. *Photochem Photobiol* 1976;23:461–73.
- [27] Ximenes VF, Campa A, Catalani LH. The oxidation of indole derivatives catalyzed by horseradish peroxidase is highly chemiluminescent. *Arch Biochem Biophys* 2001;387:173–9.
- [28] Ryting ME, Kantarjian H, Albitar M. Acute lymphoblastic leukemia with Burkitt-like morphologic features and high myeloperoxidase activity. *Am J Clin Pathol* 2009;132:182–5. quiz 306.
- [29] Weston KM. A primer of drug action. *Midwifery* 1998;14:194–5.
- [30] Klebanoff SJ, Kettle AJ, Rosen H, Winterbourn CC, Nauseef WM. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J Leukoc Biol* 2013;93:185–98.

- [31] Winterbourn CC, Kettle AJ. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid Redox Signal* 2013;18:642–60.
- [32] Haptom MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophils phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. *Blood* 1998;92:3007–17.
- [33] Gomes MM, Dörr FA, Catalani LH, Campa A. Oxidation of lysergic acid diethylamide (LSD) by peroxidases: a new metabolic pathway. *Forensic Toxicol* 2012;30:87–97.
- [34] Kettle AJ, Winterbourn CC. Superoxide-dependent hydroxylation by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 1994;269:17146–51.
- [35] Herrera F, Martin V, Carrera P, Garcia-Santos G, Rodriguez-Blanco J, Rodriguez C, et al. Tryptamine induces cell death with ultrastructural features of autophagy in neurons and glia: possible relevance for neurodegenerative disorders. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2006;288A:1026–30.
- [36] Paley EL, Perry G, Sokolova O. Tryptamine induces axonopathy and mitochondriopathy mimicking neurodegenerative diseases via tryptophanyl-tRNA deficiency. *Curr Alzheimer Res* 2013;10:987–1004.
- [37] Riba J, McIlhenny EH, Valle M, Bouso JC, Barker SA. Metabolism and disposition of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids after oral administration of ayahuasca. *Drug Test Anal* 2012;4:610–6.
- [38] Barker SA, McIlhenny EH, Strassman R. A critical review of reports of endogenous psychedelic N,N-dimethyltryptamines in humans: 1955–2010. *Drug Test Anal* 2012;4:617–35.
- [39] Barker SA, Borjigin J, Lomnicka I, Strassman R. LC/MS/MS analysis of the endogenous dimethyltryptamine hallucinogens, their precursors, and major metabolites in rat pineal gland microdialysate. *Biomed Chromatogr* 2013;27:1690–700.
- [40] McIlhenny EH, Riba J, Barbanjo MJ, Strassman R, Barker SA. Methodology for determining major constituents of ayahuasca and their metabolites in blood. *Biomed Chromatogr* 2012;26:301–13.
- [41] Lester MB, Prickett JI. Hypotheses regarding the mechanisms of ayahuasca in the treatment of addictions. *J Psychoactive Drugs* 2012;44:200–8.
- [42] Daumann J, Wagner D, Heekerlen K, Neukirch A, Thiel CM, Gouzoulis-Mayfrank E. Neuronal correlates of visual and auditory alertness in the DMT and ketamine model of psychosis. *J Psychopharmacol* 2010;24:1515–24.
- [43] Wallach JV. Endogenous hallucinogens as ligands of the trace amine receptors: a possible role in sensory perception. *Med Hypotheses* 2009;72:91–4.
- [44] Emanuele E, Colombo R, Martinelli V, Brondino N, Marini M, Bosco M, et al. Elevated urine levels of bufotenine in patients with autistic spectrum disorders and schizophrenia. *Neuro Endocrinol Lett* 2010;31:117–21.
- [45] Bouso JC, Gonzalez D, Fondevila S, Cutchet M, Fernandez X, Ribeiro Barbosa PC, et al. Personality, psychopathology, life attitudes and neuropsychological performance among ritual users of ayahuasca: a longitudinal study. *PLoS One* 2012;7:e42421.
- [46] Grob CS, Danforth AL, Chopra GS, Hagerty M, McKay CR, Halberstadt AL, et al. Pilot study of psilocybin treatment for anxiety in patients with advanced-stage cancer. *Arch Gen Psychiatry* 2011;68:71–8.
- [47] Ferry G, Ubeaud C, Lambert PH, Bertin S, Coge F, Chomarat P, et al. Molecular evidence that melatonin is enzymatically oxidized in a different manner than tryptophan: investigations with both indoleamine 2,3-dioxygenase and myeloperoxidase. *Biochem J* 2005;388:205–15.
- [48] Ximenes VF, Catalani LH, Campa A. Oxidation of melatonin and tryptophan by an HRP cycle involving compound III. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287:130–4.
- [49] Huether G, Fettkotter I, Keilhoff G, Wolf G. Serotonin acts as a radical scavenger and is oxidized to a dimer during the respiratory burst of activated microglia. *J Neurochem* 1997;69:2096–101.
- [50] Jia L, Tian P, Ding C. Immunoregulatory effects of indoleamine 2,3-dioxygenase in transplantation. *Transpl Immunol* 2009;21:18–22.