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

**Produção de quinurenina em modelos
experimentais de restrição de sono e obesidade**

Alexandre Fróes Marchi

Dissertação de para obtenção de grau

MESTRE

Orientadora:

Profa. Titular Ana Campa

São Paulo

2015

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

**Produção de quinurenina em modelos
experimentais de restrição de sono e obesidade**

Alexandre Fróes Marchi

Dissertação de para obtenção de grau

MESTRE

Orientadora:

Profa. Titular Ana Campa

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica

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

Marchi, Alexandre Fróes

M317p Produção de quinurenina em modelos experimentais de restrição
de sono e obesidade / Alexandre Fróes Marchi. -- São Paulo,
2015.
61p.

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

Orientador: Campa, Ana

1. Toxicologia clínica 2. Bioquímica clínica 3. Enzimas I. T.
II. Campa, Ana, orientador.

615.9 CDD

Alexandre Fróes Marchi

**Produção de quinurenina em modelos experimentais
de restrição de sono e obesidade**

Comissão julgadora da

Dissertação para obtenção de Grau Mestre

Prof.^a Titular Ana Campa

Presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, _____ de _____ de _____

Agradecimentos

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo em nome da sua diretora, Dra. Terezinha de Jesus pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas em nome do seu chefe Prof. Dr. Ernani Pinto Junior.

Ao Programa de Pós Graduação em Farmácia, Área de Análises Toxicológicas e Toxicologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas em nome do seu coordenador Prof. Dr. Ernani Pinto Junior.

À querida Profa. Titular Ana Campa, pela orientação e pelo aprendizado de vida, além da paciência que teve.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, pela concessão dos recursos financeiros para a execução do projeto.

Ao Prof. Dr. Jair Ribeiro Chagas pelo apoio durante a realização do projeto.

Aos professores Dr. Jair Ribeiro Chagas, Dr. Joilson de Oliveira Martins e Dr. Ernani Pinto Junior e Prof.^a Monica Levy Andersen pelas sugestões na banca.

À Silene, pela ajuda durante a hora de trabalho sendo minhas mãos e antebraços. Muito obrigado!!

Ao Edson Mendes de Oliveira, pela ajuda e ideias durante o projeto.

Ao Renan Orsati Clara, pela ajuda e ideias durante a realização do trabalho.

À Bruna Visniaukas e Gabriela Polster, pela ajuda no decorrer da realização do projeto.

À Prof.^a Titular Dulcineia S.P. Abdalla, pela ajuda no projeto.

À Jacqueline Cavalcante Silva, pela ajuda durante a realização do projeto.

À Fabi, por muitas vezes, abrir o freezer durante o projeto.

À querida Luciene, pelo apoio incondicional. Sem palavras para agradecer!!

Aos meus colegas do Laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela convivência.

Aos funcionários do Departamento de Análises Toxicológicas e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

À querida prof.^a Elvira pelo apoio.

A Deus!!

Aos meus pais!! Sem palavras para agradecer!!

À Selma de Lima, João Roberto de Lima e família pelo apoio e orações.

Aos amigos que fiz durante o Mestrado: Clovis Paniz, Juliano Bertinato, Marcela Bach, Juliana Martinez, Evandro, Maryana Branquinho, Maylla Lucena, Guilherme Wataru, Aécio Braga, Douglas, Claudinha, Rose, Renata, Maurício e muitos outros....

Sumário	Pág
1. Introdução.....	1
1.1 Metabolismo do Triptofano.....	1
1.2 Triptofano, quinurenina e sistema imune.....	4
1.3 Restrição de sono: Modelo e relação com sistema imune.....	5
1.4 Obesidade: Modelo e relação com sistema imune.....	9
2. Objetivos.....	14
3. Materiais e Métodos.....	15
3.1 Modelos animais.....	15
3.1.1 Modelos de restrição de sono (RS).....	15
3.1.1.1 Modelo de restrição de sono (RS) em camundongos.....	16
3.1.1.2 Modelo de privação de sono paradoxal (PSP) em camundongos.....	17
3.1.1.3 Modelo de privação de sono paradoxal (PSP) seguido por período rebote (PR) em camundongos.....	17
3.1.1.4 Modelo de privação de sono paradoxal (PSP) em ratos.....	17
3.1.1.5 Modelo de privação de sono paradoxal seguido por período rebote (PR) em ratos.....	18
3.1.2 Modelos de obesidade.....	18
3.1.2.1 Modelo de obesidade induzida por ração hiperlipídica (RH) em camundongos.....	18
3.1.2.2 Modelo de síndrome metabólica.....	23
3.2 Quantificação de quinurenina.....	28
3.2.1 Extração de Quinurenina.....	28
3.2.1.1 Protocolo utilizando solvente metanol (Chen et al, 2008) para extração de Quin das amostras de fígados provenientes de camundongos C57BL/6J dos modelos RS 15 d, PSP 72 h e PR 24 h para análise em HPLC.....	28
3.2.1.2 Protocolo utilizando solvente acetonitrila para extração de Quin das amostras de plasma de ratos Wistar provenientes dos modelos PSP 24, 48, 72 e 96 h e PR 48 e 72 h para análise em HPLC.....	28

3.2.1.3	Protocolo utilizando solvente acetonitrila para extração de Quin com amostras de soro provenientes de camundongos C57BL/6J dos modelos RS 15 dias, PSP 72 h e PR 24 h para análise em LC-MS.....	29
3.2.2	Instrumentação analítica de Quin.....	30
3.2.2.1	Instrumentação analítica do HPLC.....	30
3.2.2.2	Instrumentação analítica do LC-MS.....	32
3.2.3	Recuperação.....	34
3.2.4	Análises estatística.....	34
4.	Resultados e Discussão.....	35
4.1	Quantificação de Trp e Quin em modelo de restrição de sono em camundongos.....	35
4.1.1	Quantificação de Trp e Quin hepática.....	35
4.1.2	Quantificação de Trp e Quin sérica.....	36
4.2	Modelos privação de sono paradoxal (PSP) e privação de sono paradoxal seguido por período rebote (PR) em ratos.....	38
4.2.1	Quantificação de Trp e Quin plasmática.....	38
4.3	Modelos de obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos.....	39
4.3.1	Quantificação de Trp e Quin hepática.....	39
4.4	Modelos de Síndrome Metabólica em camundongos.....	40
4.4.1	Quantificação Quin e Trp sérica.....	40
5.	Conclusão.....	42
6.	Referências.....	43
7.	Anexos.....	52

Lista de figuras

Figura 1. Vias metabólicas do Triptofano – adaptado de Zagawenski *et al.*, 2008.....2

Figura 2. Reação limitante da via das Quinureninas do Metabolismo de Triptofano adaptado de Opitz *et al.*, 007.....3

Figura 3. Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD. (A) o pico de Trp no tempo de retenção de 21 min ($\lambda = 280$ nm) e (B) de quinurenina (Quin) no tempo de retenção de 14 min ($\lambda = 365$ nm).....31

Figura 4. Curva padrão de Quin (1) e de Trp (2) realizado por HPLC-DAD. 32

Figura 5. (A) Quantificação de quinurenina em fígado de camundongos machos C57B/6 nos grupos controle (n=15), modelos de 15 dias de restrição de sono (RS) (n=12), 72 h privação de sono (n=17) e 24 h de período rebote (PR) (n=14). (B) Razão quinurenina e triptofano (Razão Quin/Trp) no fígado dos modelos restrição de sono (RS), privação de sono paradoxal (PSP) e período rebote (PR)..... 36

Figura 6. (A) Quantificação de quinurenina (Quin) sérica dos modelos de restrição de sono (RS). Os camundongos machos C57BL/6 foram separados em controle (n=14), 15 dias de RS (n=12), 72 h de PSP (n=13) e 24 h de período de rebote (PR) (n=12). (B) Razão quinurenina e triptofano (Razão Quin/Trp) sérica dos modelos restrição de sono (RS), privação de sono paradoxal (PSP) e período rebote (PR). 37

Figura 7. (A) Quantificação de quinurenina (Quin) plasmáticas de ratos Wistar. Foram avaliados os grupos controle (n=8), privação de sono paradoxal (PSP) de 24 (n=8), 48 (n=8), 72 (n=7) e 96 (n=8) e período rebote (PR) de 48h (n=6) e 72h (n=7). (B) Razão quinurenina e triptofano (Razão Quin/Trp) de plasma o dos modelos restrição de sono (RS), privação de sono paradoxal (PSP) e período rebote (PR)..... 39

Figura 8. (A) Quantificação de quinurenina (Quin) hepática do grupo controle e do grupo ração hiperlipídica (os animais receberam a ração hiperlipídica por 10 semanas) estabelecidos no modelo de ração hiperlipídica (RH). (B) Razão de quinurenina/triptofano (Quin/Trp) do grupo RH e grupo controle do modelo experimental RH (n=3). 40

Figura 9. (A) Quantificação de quinurenina (Quin) sérica do modelo de síndrome metabólica (SM). (B) Razão de quinurenina por triptofano (Quin/Trp) do modelo de síndrome metabólica(n=5) 41

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição da ração hiperlipídica	19
Tabela 2. Composição da mistura salínica da ração hiperlipídica.....	21
Tabela 3. Composição da mistura vitamínica da ração hiperlipídica.....	22
Tabela 4. Composição das rações controle e hiperlipídica do modelo síndrome metabólica.....	24
Tabela 5. Características dos camundongos grupo controle e hiperlipídico com síndrome metabólica após 20 semanas de dieta.....	27
Tabela 6. Relação da m/z dos metabólitos no LC-MS.....	33

Lista de Abreviaturas

AADC(DDC): L-aminoácidos aromáticos descarboxilase

ACN: Acetonitrila

AGL: Ácidos graxos livres

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

AMK: N1-acetil- α 5-metoxiquinuramina

DAD: Detector arranjo de diodos

HIOMT: Hidróxi indol-O-metiltransferase

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

IDO: Indolamina 2,3-dioxigenase

IL: Interleucina

INMT: Triptamina-N-metil-transferase

LC-MS: Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa

MMPM: Método de plataforma múltipla modificada

MPO: Enzima mieloperoxidase

NAT(AANAT): N- acetiltransferase

PBS: Tampão fosfato salina

PSP: Privação de sono paradoxal

Quin: Quinurenina

Razão Quin/Trp: Razão quinurenina/triptofano

RH: Razão hiperlipídica

RS: Restrição de sono

PR: Período rebote

TDO: Triptofano 2,3-dioxigenase

TNF- α : Fator necrose tumoral- α

TPH: Triptofano hidroxilase

Trp: Triptofano

UV: Ultravioleta

Vis: Visível

5-HTP: 5-hidróxi-triptofano

Resumo

Produção de quinurenina em modelos experimentais de restrição de sono e obesidade. Alexandre Fróes Marchi, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2015.

A via das Quinureninas (Via Quin) representa a principal via catabólica do metabolismo do triptofano (Trp) e é essencial para diversos processos fisiológicos. No fígado, o Trp é catalisado por triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) quinurenina (Quin). A mesma reação também pode ser catalisada pela enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), produzida por células imunológicas. Em alguns processos patológicos, há um aumento do consumo de Trp pela Via Quin, que gera compostos que estão relacionados ao processo de imunotolerância. No presente estudo, foram selecionados dois modelos que mimetizam situações associadas às alterações da resposta imunológica: a restrição de sono e a obesidade. A partir do conhecimento das alterações na resposta imune nessas condições, geramos a hipótese de que parte do mecanismo se dê a partir da indução do catabolismo de Trp pela via Quin. Desse modo, foram investigadas as concentrações séricas e hepáticas de Trp nesses modelos experimentais, modelos esses que foram utilizados em outros projetos do nosso grupo de pesquisa. Não houve diferença significativa na concentração de Quin sérica e hepática entre os camundongos C57BL/6J restritos de sono (3 hs/15 dias), privação de sono paradoxal (72 hs) e período rebote (24 hs). A razão Quin/Trp também não diferiu entre os grupos RS e controle. Igualmente não houve diferenças estatísticas na concentração de Quin plasmática nos modelos privação de sono paradoxal e período rebote realizados em ratos Wistar. O mesmo foi observado em camundongos Swiss e camundongos C57BL/6J submetidos a protocolos experimentais de obesidade: ração hiperlipídica (21 dias) e de síndrome metabólica (20 semanas de ração hiperlipídica). Tais resultados sugerem que as alterações na resposta imunológica nesses quadros não estão associadas ao catabolismo de Trp.

Palavras chave: restrição de sono, obesidade, metabolismo, triptofano quinurenina.

Abstract

Kynurenine production in obese and sleep restricted experimental models. Alexandre Fróes Marchi, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2015.

The Kynurenine pathway (Kyn pathway) is the major catabolic pathway of tryptophan metabolism (Trp) and it is essential for many physiological processes. In the liver, Trp is catalyzed by tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO), producing kynurenine (Kyn). The same reaction can also be catalyzed by the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), produced by immune cells. In some pathological conditions, there is a high Trp consumption by Kyn pathway, that generate compounds related to immune tolerance. In this study, we chose two models strongly associated with changes in the immune response: sleep restriction and obesity. From the knowledge that there are immune response alterations in those conditions, we generated the hypothesis that in part, those alterations are correlated with induction the Trp catabolism by Kyn pathway. Thus, serum and liver concentrations of Trp and Kyn were investigated in these experimental models that have been used in other projects of our research group. There was no significant difference in concentration of Kyn in serum and liver among mice C57BL/6J induced to restricted sleep (3 hours / 15 days), paradoxical sleep deprivation (72 hours) and rebound period (24 hours). The Kyn/Trp ratio did not differ between control group and RS group. Also there were no statistical differences in plasma concentration of Kyn in paradoxical sleep deprivation and rebound period models performed in rats Wistar. The same profile was also observed in Swiss e C57BL/6J mice subjected to experimental obesity protocols: fat diet (21 days) and metabolic syndrome (20 weeks of fat diet). These results suggest that changes in the immune response in the conditions tested above are not associated with Trp catabolism.

Keywords: sleep restriction, obesity, tryptophan, metabolism, kynurenine.

1.Introdução

1.1. Metabolismo do Triptofano

O triptofano (Trp) é o aminoácido essencial menos abundante no organismo. É utilizado para a síntese de proteínas e a biossíntese de diversos compostos, sendo catabolizado principalmente pela Via das Quinureninas (Via Quin) (Ball *et al.*, 2009).

A quinurenina (Quin) é o produto inicial da oxidação do triptofano (Trp) pela via Quin (Cherayil, 2009). A síntese de Quin a partir de Trp pode ocorrer pela ação de duas oxigenases, a triptofano 2,3- dioxigenase (TDO), presente no fígado, e a indolamina 2,3- dioxigenase (IDO), presente em diversos tecidos incluindo células do sistema imune. A reação que leva à síntese de Quin é considerada limitante para a metabolização do Trp por essa via (Thomas, Witting e Drummond, 2008).

O Trp pode ser catalisado por outra via metabólica, a via serotoninérgica, que leva a produção de serotonina e melatonina, entre outros compostos (Nordlind, Azmitia e Slominski, 2008). Apesar das Vias Quin e serotoninérgica somadas serem responsáveis pela quase totalidade do metabolismo de Trp, uma pequena parte do Trp é convertida em dimetiltriptamina (DMT), especialmente em algumas células do sistema nervoso central (Jacob e Presti, 2005)(**Figura 1**).

Figura 1. Vias metabólicas do Triptofano - adaptado de Zagawenski *et al.*, 2008

A Via Quin tem recebido forte atenção devido a importância de Quin sobre o sistema imunológico. O estudo da reação limitante é essencial para o entendimento da metabolização dessa via. Ambas TDO e IDO são heme-enzimas, porém TDO possui apenas 10% de homologia com a IDO. Essas enzimas clivam a ligação 2,3-dupla do anel indólico do triptofano, formando N-formilquinurenina (Li *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007)(**Figura 2**). A ligação da enzima TDO é mais específica para o L-triptofano. A expressão de TDO pode ser induzida por triptofano, quinurenina e glicocorticóides, como o cortisol (Oxenkrug, 2010b; Dolusic *et al.*, 2011) e a dexametasona (Ren e Correia, 2000).

A IDO é uma proteína formada por dois domínios unidos por um *loop* contendo um grupo heme na estrutura (Forouhar *et al.*, 2007). Esta enzima é indutível e é expressa no cordão umbilical, pulmão, células de linhagem mielóide e fibroblastos (King e Thomas, 2007). A reação enzimática realizada por TDO e IDO

ocorre pela redução eletrônica do átomo de ferro presente no grupo heme que sai do seu estado férrico (Fe^{3+}) para o estado ferroso (Fe^{2+}), facilitando a ligação do triptofano e do íon superóxido ao sítio enzimático com posterior oxidação do anel pirrólico (Cherayil, 2009).

Figura 2. Reação limitante da via das Quinureninas do Metabolismo de triptofano – adaptado de Opitz *et al.*, 2007.

A IDO possui duas isoformas, IDO1, acima apresentada e a isoforma IDO 2, que pode ser expressa em tumores de fígado, pulmão, rins, cérebro e pâncreas. A enzima possui 43% de homologia com a IDO 1, catalisa os mesmos substratos, porém com menor eficiência (Metz *et al.*, 2007; Ball *et al.*, 2009). Ensaios de imunohistoquímica realizados em tumores de pâncreas mostraram aumento de expressão de IDO2 revelando que, além de IDO1, a IDO2 está relacionada com os processos de imunotolerância tumoral e imunoescape (Witkiewicz *et al.*, 2009).

A expressão de IDO 1 pode ser induzida pela citocina inflamatória IFN- γ . Esta citocina regula o complexo classe II de histocompatibilidade principal, atuando sobre

as células apresentadoras de antígenos e regulando a resposta inflamatória (Katz, Muller e Prendergast, 2008).

O estudo das concentrações de Trp e Quin em fluidos biológicos é muito importante já que o cálculo da razão Quin/Trp pode estimar a atividade funcional da enzima IDO. O aumento dessa razão está relacionado a patologias como infecções, doenças auto-imunes e na rejeição em transplantes (Sucher *et al.*, 2010). A atividade de IDO fortemente associada ao processo de tolerância imunológica, gerando anergia da resposta imune (Mellor e Munn, 2004).

1.2 Triptofano, quinurenina e sistema imune

A depleção do Trp é considerada um dos mecanismos de defesa induzido por IFN- γ em células imunocompetentes durante a resposta imune, já que essa citocina é o principal indutor da enzima IDO. Este fenômeno atua como um mecanismo efetor antimicrobiano ou antitumoral e limita o crescimento de agentes patogênicos (Schrocksnadel *et al.*, 2006). Entretanto, a degradação de Trp também causa a supressão das células T e induz o fenótipo regulatório nessas células (Treg) (Katz, Muller e Prendergast, 2008).

Estudos utilizando o inibidor de IDO (1-metilriptofano, 1-MT) demonstram que a enzima é responsável por mediar tolerância em camundongos fêmeas grávidas. Após o tratamento com 1-MT, as fêmeas rejeitaram e perderam a prole. O mecanismo pelo qual ocorre o processo tolerogênico ainda não foi explicado, mas acredita-se que a enzima IDO mantenha a proteção imunológica eficaz durante a gestação (Mellor e Munn, 1999).

As células dendríticas (CD) estão envolvidas na apresentação dos antígenos para as células T e B. As CDs podem ativar os linfócitos T diante de um antígeno ou induzir a tolerância (Prendergast, 2008). A modulação da tolerância pelas células dendríticas está diretamente associada ao metabolismo do Trp, uma vez que é bem descrita a comunicação mediada por IDO entre células dendríticas e o desenvolvimento do fenótipo regulatório em células T (Mellor e Munn, 2004). Além das células T, os monócitos também sofrem ação dos metabólitos de Trp. Como por exemplo, ácido 3-hidróxi-antranílico, um metabólito da via Quin, induz apoptose de monócitos (Moffett e Namboodiri, 2003).

Não é possível falar da relação do sistema imunológico com o metabolismo de Trp sem falar de Quin, já que essa é uma das principais moléculas responsáveis pelos processos de imunotolerância e imunoescape (Prendergast, Metz e Muller, 2010). O mecanismo de ação de Quin envolve a ligação ao receptor aril hidrocarboneto (AHR) (Opitz *et al.*, 2011; Prendergast, 2011). O AHR é um receptor que foi primeiramente descrito como ligante de xenobióticos (Opitz *et al.*, 2011), e está envolvido com resposta inflamatória e proliferação celular.

1.3 Restrição de sono: Modelo e relação com sistema imune

O estilo de vida urbano moderno tem levado a uma diminuição constante no tempo de sono médio, o que resultou no aumento de morbidades e susceptibilidade a infecção (Bollinger *et al.*, 2010). Estudo realizado por três décadas (1987, 1995 e 2007) com pacientes entre 20 e 80 anos, através de questionários, mostrou que a população da cidade de São Paulo tem dificuldade em iniciar e manter o sono. O mesmo estudo evidenciou que a prevalência de mulheres que apresentaram dificuldade de iniciar o sono foi maior em 2007 em relação aos anos anteriores. O

ronco foi o distúrbio do sono mais observado em homens por consequência da idade e obesidade. Igualmente houve aumento das outras disfunções do sono como bruxismo noturno, pesadelos e paralisia do sono nos pacientes avaliados (Santos-Silva *et al.*, 2010) .

O sono é composto por duas fases principais: movimento não rápido do olho (NREM) e movimento ocular rápido (REM). No encefalograma (EEG), o sono NREM apresenta ondas de sono sincronizadas de alta amplitude e a frequência baixa. O sono NREM é dividido em três fases (N1, N2 e N3). A divisão mais fina do sono NREM é baseada nas ondas de baixa frequência e alta amplitude chamada de sono de ondas lentas (SOL) (Stevens *et al.*, 2011). O sono NREM é caracterizado pela diminuição da frequência cardíaca e respiratória, da pressão arterial e da temperatura corporal (Porkka-Heiskanen, Zitting e Wigren, 2013).

O sono REM é caracterizado pelos movimentos rápidos dos olhos com a duração de um ciclo de sono, cerca de, 90 min. Adicionalmente, é observada a atividade onírica nessa fase do sono(Jouvet *et al.*, 1964). No sono REM, o tônus muscular diminui drasticamente e todos os outros músculos esqueléticos ficam paralisados. A frequência cardíaca e pressão arterial estão aumentadas, enquanto a regulação da temperatura esta diminuída bem como a respiração se torna irregular (Porkka-Heiskanen, Zitting e Wigren, 2013).

Para estudo da restrição de sono diferentes metodologias têm sido utilizadas, como o método de plataformas múltiplas modificadas (MMPM) (Zager *et al.*, 2007). Neste método, as plataformas múltiplas ficam posicionadas 1 cm acima do nível da água em tanques. Nas plataformas, os animais podem se movimentar sem isolamento social. O princípio dessa metodologia baseia-se no fato de que durante o

sono, principalmente durante o sono paradoxal, há atonia muscular, o que faz com que os animais caiam na água e assim, acordem (Jouvet *et al.*, 1964).

Os animais mais utilizados para estudo do sono são os roedores que apresentam fases do sono NREM e REM similares às de humanos. Entretanto, os roedores apresentam ciclo de sono invertido e menores intervalos de sono REM (Toth e Bhargava, 2013). O sono REM é conhecido como sono paradoxal, termo introduzido por Jouvet em 1964, nos ensaios com ratos e camundongos (Tufik *et al.*, 2009) e é muito estudado para estabelecer mecanismos da relação do sono com sistema imune (Manzar *et al.*, 2012).

Nestes modelos experimentais, os animais são submetidos à perda de sono paradoxal durante períodos agudos e crônicos, conhecidos como privação de sono paradoxal (PSP) e restrição de sono (RS), respectivamente. O modelo de RS utilizado é de 6 horas de sono e restrição de 18 h por 21 dias (Machado, Suchecki e Tufik, 2005). O modelo de privação de sono paradoxal é realizado em por períodos variáveis de 24 h até 96 h em camundongos e ratos no qual a fase REM é completamente inibida bem como ocorre a diminuição de SOL em valores próximos a 37% (Machado *et al.*, 2004; Machado, Suchecki e Tufik, 2005). Após os períodos RS e PSP, há um período rebote, no qual os animais podem compensar a perda de sono e dormir. O período rebote possibilita estudos para a compreensão do efeito compensatório causado no organismo pela ausência de sono (Machado, Suchecki e Tufik, 2005).

A indução do sono está relacionada com alterações de neurotransmissores, por exemplo, serotonina (Rosenthal, 1998). A deficiência de serotonina e formação de Quin são fatores etiológicos no desenvolvimento no desenvolvimento de disfunções psíquicas como a depressão (Oxenkrug, 2010b). Os metabólitos

biologicamente ativos provenientes de Quin estão associadas com disfunções degenerativas como doença de Alzheimer, Doença de Huntington e demência (Braidy *et al.*, 2011).

A melatonina é outro metabólito proveniente do Trp que é muito estudado. A melatonina é secretada pela glândula pineal e é sincronizada pelo ciclo claro escuro através das fibras retino-hipotalâmica que inibem a síntese da melatonina durante o dia na presença de luz. A melatonina é um sincronizador endógeno e está associada a distúrbios do sono como a alteração do ritmo circadiano e a insônia, por exemplo, trabalhadores noturnos apresentam redução da melatonina e padrões de sono alterado. A melatonina também está relacionada com distúrbios da função imune, danos oxidativos e doenças psíquicas nos quais pacientes com transtorno depressivo apresentam perda de sono e baixas concentrações de melatonina (Claustrat, Brun e Chazot, 2005; Pandi-Perumal *et al.*, 2006).

A perda de sono pode aumentar os níveis de cortisol, lipídios e resistência insulínica, que têm sido associados ao aumento de doença cardiovasculares e diabetes tipo II. Adicionalmente, a perda de sono em indivíduos pode causar perda cognitiva e mau humor (Pawl *et al.*, 2013).

A privação e a restrição de sono em humanos resultam em diminuição da função do sistema imunológico (Stevens *et al.*, 2011,). A restrição de sono tem como efeito secundário um risco aumentado para o desenvolvimento de diversas doenças, tornando o indivíduo suscetível a infecções ou reduzindo a resposta imune a antígenos (Besedovsky, Lange e Born, 2012). Assim, o sono é essencial para a regulação da resposta imunológica (Bollinger *et al.*, 2010). Por outro lado, infecções podem interferir na regulação do sono através de citocinas pró-inflamatórias (Bryant, Trinder e Curtis, 2004).

Ensaio com ratos Wistar restritos de sono por 21 dias e privados de sono paradoxal 72 h foram realizados para avaliar a resposta imune nessas duas condições. O grupo restrito de sono apresentou menor número de linfócitos totais e monócitos quando comparados ao grupo controle. Além disso, o baço retirado do grupo privado paradoxal (PSP) 72 h *post mortem* estava menor quando comparado ao controle. O baço é o órgão importante para a diferenciação e proliferação de linfócitos B. A diminuição do tamanho deste órgão linfóide pode indicar alteração da resposta imune (Zager *et al.*, 2007).

Maragno-Correa e colaboradores (2013) estudaram a relação do sono e sistema imune diante a inoculação de células tumorais de ascite de Ehrlich. O grupo privado de sono 72 h com tumor mostrou diminuição da população de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no baço de camundongos Balb/c comparado ao grupo de animais apenas com as células tumorais. Além disso, o grupo PSP 72 h com o tumor apresentou menor tempo de vida quando comparados ao grupo de animais inoculados com as células tumorais.

1.4 Obesidade: Modelo e relação com sistema imune

A incidência de obesidade está aumentando dramaticamente em todo o mundo e está associada com complicações que podem diminuir a expectativa de vida da população. O excessivo acúmulo de gordura aumenta o risco global de morbidades (Wolowczuk *et al.*, 2012).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2010, a massa corporal dos brasileiros aumentou nos últimos anos. A incidência de excesso de peso em homens adultos subiu de 18,5% para 50,1%. O mesmo ocorreu com as mulheres, que foi de 28,7% para 48%. A obesidade e o excesso de peso são encontrados com grande frequência, a partir de 5 anos de idade, em todas as faixas

de renda e em todas as regiões do país. O método mais comum para definir a obesidade é baseado no índice de massa corpórea (IMC) (isto é, a massa de uma pessoa [kg] dividida pelo quadrado da sua altura [m]). A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera um IMC entre 20 e 25 kg/m² como normal, IMC entre 25 e 30 kg/m² como sobrepeso, e um IMC de 30 kg/m² ou mais como obesos (Stenvinkel, Zoccali e Ikizler, 2013).

A obesidade é uma doença multifatorial causada principalmente pela interação de fatores genéticos e ambientais. O aumento dos depósitos de gordura corporal coincide geralmente com aumento da massa corporal, levando a um maior risco de comorbidades e afetando a qualidade de vida (Aballay *et al.*, 2013) que favorecem ao desenvolvimento de doenças como resistência insulínica, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (Catalán *et al.*, 2013).

Os adipócitos, células altamente diferenciadas nos tecidos adiposos, sintetizam e liberam uma variedade de substâncias que incluem proteína C reativa, angiotensina, fator de necrose tumoral (TNF- α), adiponectina e resistina, moléculas essas que também estão envolvidas com doenças crônicas (Aballay *et al.*, 2013).

A redução da perfusão de oxigênio gera hipóxia do tecido adiposo. O principal regulador da homeostase do oxigênio é o fator induzível por hipóxia (HIF)-1 α que se encontra elevado no tecido adiposo de pacientes obesos. O HIF-1 α influencia as imunidades inata e adaptativa, principalmente, nas funções das células mielóides, neutrófilos, macrófagos e na regulação de linfócitos (Louie, Roberts e Nomura, 2013). Além disso, a hipóxia é capaz de induzir a angiogênese, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (Cancello *et al.*, 2005; Catalán *et al.*, 2013).

Outro efeito da obesidade é a contínua liberação de ácidos graxos livres (AGL) que são diretamente transferidos, através da veia porta, para o fígado. O

aumento de AGL no plasma, em conjunto com citocinas inflamatórias e lipoxinas, provoca uma diminuição na sensibilidade à insulina em tecidos que dependem de insulina (Flegal *et al.*, 2010; Choi e Ginsberg, 2011). Os AGL liberados no plasma são oxidados no fígado provocando aumento da neoglicogênese e da glicemia. A diminuição da sensibilidade ao receptor insulínico é descrito como resistência insulínica, que promove o aumento da síntese de insulina pelas células pancreáticas, e conseqüentemente, uma hiperinsulinemia compensatória que cronicamente pode evoluir a intolerância insulínica (Aballay *et al.*, 2013). O aumento de insulina sinaliza para a recaptação de glicose, transporte de aminoácidos e ativa o metabolismo lipídico. Essas condições podem modular a função e atividade do sistema imune, principalmente as células T. A diminuição de glicose pode diminuir a atividade e proliferação de linfócitos T. A insulina também causa a promoção do fenótipo Th2 enquanto a resistência insulínica favorece o fenótipo Th1. Diversos estudos estão sendo realizados para esclarecer os efeitos entre a insulina e a resistência insulínica sobre células imunes (Milner e Beck, 2012).

Diante do aumento do tecido adiposo e a contínua liberação de AGL, há ativação dos macrófagos de caráter M1 no tecido adiposo (Nieman *et al.*, 2013). O HIF-1 α também é responsável pela ativação de macrófagos M1 (Gale e Maxwell, 2010). Os macrófagos M1 são fagocíticos e produzem citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ (Catalán *et al.*, 2013). O IFN- γ também é produzido pelos linfócitos T, estimulando outras células imunológicas, como os macrófagos (Perez de Heredia, Gomez-Martinez e Marcos, 2012).

Os linfócitos T e B ativados estão associados com a intolerância insulínica (Patel *et al.*, 2013). As células dentríticas (CD) também foram associadas com o desenvolvimento da obesidade e disfunções metabólicas. Estudos no tecido adiposo

de camundongos obesos mostraram a presença macrófagos M1 ativados pela interação com CDs (Stefanovic-Racic *et al.*, 2012).

Em condições normais, o tecido adiposo normal apresenta maior prevalência de macrófagos de caráter M2. Estes macrófagos M2 produzem citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e estão envolvidos com o reparo tecidual (Lumeng *et al.*, 2008). Do mesmo modo, os linfócitos T *helper* e linfócitos T reguladores são prevalentes no tecido adiposo. Estes linfócitos produzem sinais antiinflamatórios e induzem o fenótipo de macrófagos para M2 (Patel *et al.*, 2013).

Além da alteração do fenótipo dos macrófagos, o excesso de peso causa alterações no sistema imune como o aumento de leucócitos totais, o aumento de neutrófilos e monócitos. Entretanto, a proliferação de linfócitos B e T estão diminuídas na presença de antígenos (Perez de Heredia, Gomez-Martinez e Marcos, 2012). Pacientes obesos apresentaram menor produção de anticorpos e linfócitos CD8⁺ após a vacinação contra H1N1 quando comparado ao grupo controle. Os autores descreveram a necessidade de reposição da vacinação, pois pacientes obesos apresentaram baixa resposta imune diante aos antígenos virais, além de serem mais suscetíveis a novas infecções (Sheridan *et al.*, 2012)

A síntese de Quin e a depleção de Trp também estão associadas com o desenvolvimento da obesidade. A diminuição de Trp pode resultar em menor produção de serotonina que favorece principalmente a depressão, alteração de humor e saciedade. Estas condições predispõem a ingestão hipercalórica como efeito compensatório para a baixa concentração de serotonina no sistema nervoso central que conseqüentemente está relacionada as co-morbidades da obesidade (Breum *et al.*, 2003; Brandacher *et al.*, 2007).

As alterações metabólicas causadas pela inflamação e resistência insulínica estão envolvidas com a síndrome metabólica (Kojima *et al.*, 2013). A síndrome metabólica é um conjunto de fatores de risco interrelacionados, incluindo a obesidade, dislipidemia aterogênica, a hipertensão arterial e resistência insulínica que aumentam exponencialmente o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes *mellitus* tipo 2 (Aballay *et al.*, 2013). Dado que a síndrome metabólica está se tornando uma pandemia mundial, com taxas de prevalência entre 20 e 30% entre a população adulta, a identificação de fatores de risco modificáveis é muito importante para a saúde pública (Ju e Choi, 2013).

Estudo em indivíduos obesos com síndrome metabólica mostrou aumento da concentração de Quin sérica quando comparados ao grupo controle. Adicionalmente, a razão Quin/Trp também estava alterada em adultos obesos com síndrome metabólica (Mangge *et al.*, 2014).

Conforme apresentado, a restrição de sono e a obesidade modificam a resposta inflamatória. Sabendo que a catálise de triptofano (Trp) à quinurenina (Quin) é um importante fator para a modulação do sistema imunológico, a hipótese da presente dissertação é de que a Quin teria contribuição na alteração da resposta imunológica diante das condições acima propostas.

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram avaliar as concentrações de Quin e Trp em fígado e soro de camundongos e ratos submetidos à restrição de sono e dieta hiperlipídica.

3. Materiais e Métodos

3. 1 Modelos animais

3.1.1 Modelos de restrição de sono

No estudo da restrição de sono foi utilizado os modelos de i) restrição de sono (RS), ii) privação de sono paradoxal (PSP) e iii) privação de sono paradoxal seguido por período rebote (PR). Os experimentos de RS foram realizados com camundongos C57BL/6J e ratos Wistar. Os ensaios com ratos Wistar foram realizadas pela doutoranda Bruna Visniaukas, enquanto os ensaios com camundongos foram realizados pela mestrandia Gabriela Polster sob orientação do Prof. Dr. Jair Ribeiro Chagas do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo.

O soro e fígado oriundo desses animais foram gentilmente cedidos e utilizados para quantificação de Trp e Quin em nosso laboratório. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (**Anexos 1 e 2**). O projeto também está de acordo com a Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (**Anexo 3**).

Os modelos RS, PSP e PR foram realizados pelo método de plataformas múltiplas (MPMM) adaptado de (Machado, Suchecki e Tufik, 2005) mantidas em condições de temperatura constante ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e sob um ciclo claro-escuro de 12 h, iniciando-se a fase clara às 7 h da manhã. A ração e água foram fornecidos *ad libitum* por meio de uma grade localizada sobre o tanque, sendo a água do tanque trocada diariamente.

O método das plataformas múltiplas (MMPM) consistiu em colocar um grupo de camundongos (n=5) em tanques de água (41 cm x 34 cm x 16,5 cm) contendo 12

plataformas de 3 cm de diâmetro, com nível de água 1 cm abaixo da superfície. Para os ratos (n=8), o MMPM foi realizado em tanques de água (123 cm x 44 cm x 44 cm) com 14 plataformas de 6,5 cm de diâmetro com o mesmo nível de água (1cm). Neste método, os animais se movimentavam dentro do tanque, de uma plataforma para outra, sem isolamento social.

Ao final de cada experimento, os animais foram imediatamente eutanasiados por decapitação. O sangue dos camundongos foi coletado em microtubos, enquanto o plasma dos ratos foi coletado e acondicionado em tubos com heparina. Após a coleta, os tubos destinados para a separação de soro foram centrifugados a 3000 rpm por 10 min à 25⁰C. O sobrenadante foi aliquotado e armazenado em microtubos a -80⁰C até a realização dos ensaios. Os órgãos foram retirados, acondicionados em microtubos e armazenados em -80⁰C.

3.1.1.1 Modelo de RS em camundongos

Para o desenvolvimento desse modelo foram utilizados camundongos machos C57BL/6J distribuídos em 2 grupos. No grupo controle, os animais foram mantidos em suas gaiolas e manipulados apenas para a limpeza da forração da gaiola. Foram mantidos na mesma sala que o grupo experimental para igualar as condições ambientais. No grupo RS, os animais passaram pela RS durante 15 dias com 21 h de privação de sono diárias e o sono era liberado apenas das 12h às 15h nas caixas-moradia.

Desse modelo foram utilizados o fígado e o soro para a análise de Quin e Trp.

3.1.1.2 Modelo de privação de sono paradoxal (PSP) em camundongos

Para o desenvolvimento desse modelo, foram utilizados camundongos machos C57BL/6J distribuídos em 2 grupos. No grupo Controle, os animais foram mantidos em suas gaiolas e manipulados apenas para a limpeza da forração da gaiola. Foram mantidos na mesma sala que o grupo experimental para igualar as condições ambientais. No grupo Privação de sono por 72 h, os animais foram submetidos à PSP de 72 h e eutanasiados após o término dos ensaios. Desse modelo, foi utilizado apenas o soro para análise de Quin e Trp.

3.1.1.3 Modelo de PSP seguido por período rebote (PR) em camundongos

Para o estudo de PSP e PR foram utilizados camundongos machos C57BL/6J que foram distribuídos em 2 grupos: grupo controle, em que os animais foram mantidos em suas gaiolas e manipulados apenas para a limpeza da forração da gaiola. Foram mantidos na mesma sala que o grupo experimental para igualar as condições ambientais; e grupo de estudo: os animais foram submetidos à privação de sono paradoxal por 72 h (PSP) e após esse período retornaram às suas gaiolas de moradia e puderam dormir por 24 h, período rebote (PR). Desse modelo, foi utilizado o soro para análise de Quin e Trp.

3.1.1.4 Modelo de PSP em ratos

Para o desenvolvimento desse modelo, foram utilizados ratos machos Wistar distribuídos em 5 grupos. Os sub-grupos foram: grupo controle: os animais foram mantidos em suas gaiolas e manipulados apenas para a limpeza da forração da

gaiola; grupo PSP por 24, 48, 72 e 96 h: os animais foram submetidos à PSP de 24, 48, 72 e 96 h e foram eutanasiados logo após o término dos ensaios. Desse modelo, foi utilizado o soro para análise de Quin e Trp.

3.1.1.5 Modelo de privação de sono paradoxal seguido por período rebote (PR) em ratos

Para o desenvolvimento desse modelo, foram utilizados ratos machos Wistar distribuídos em 3 grupos. Os grupos experimentais foram: grupo controle: os animais foram mantidos em suas gaiolas e manipulados apenas para a limpeza da forração da gaiola. E grupo de estudo PSP e PR: os animais foram submetidos à PSP de 96 h e após esse período retornaram às suas gaiolas de moradia, onde foram mantidos por 48 h e 72 h. Desse modelo, foi utilizado o plasma para análise de Quin e Trp.

3.1.2. Modelos de obesidade

3.1.2.1 Modelo de obesidade induzida por ração hiperlipídica (RH) em camundongos.

Os experimentos do modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica foram conduzidos pelo Dr. Edson Mendes de Oliveira sob orientação da Profa. Titular Ana Campa (**Anexo 4**). Para esse estudo foram utilizados camundongos machos Swiss distribuídos em 2 grupos: grupo controle seguido por RH: os animais foram mantidos em suas gaiolas e na mesma sala que o grupo experimental para igualar as condições ambientais; e grupo RH: os animais receberam a ração hiperlipídica por 21 dias após o desmame.

A ração hiperlipídica (30%) (**Tabela 1**) para camundongos adultos foi preparada e acondicionada a 4°C pelo Dr. Edson Mendes de Oliveira seguindo as

recomendações American Institute of Nutrition (AIN-93M) (Reeves, Nielsen *et al.*, 1993). Com exceção da quantidade de tert-butilhidroquinona, que foi aumentada para evitar que a ração hiperlipídica sofresse oxidação (Pang, Choi *et al.*, 2008). Por fim, os animais foram eutanasiados logo após o término dos ensaios; Desse modelo, foi utilizado o fígado para análise de Quin e Trp.

Tabela 1. Composição da ração hiperlipídica (g/kg ração).

Constituintes	Massa (g)	Marca
Amido	193,38	Maisena
Sacarose	133,56	União
Caseína	186,98	Labsynth ou Rhoster
Óleo de Soja	53,42	Liza
Banha de porco	300	Perdigão
Celulose	66,78	Rhoster
Mistura salínica	46,74	Rhoster
Mistura vitamínica	13,36	Rhoster
L-Cistina	2,4	Rhoster, Sigma ou Merck
Bitartarato de Colina	3,34	Rhoster, Sigma ou Merck
Tert-butilhidroquinona	0,04	Rhoster, Sigma ou Merck

Composição da ração de acordo com o Instituto Americano de Nutrição (Reeves, Nielsen e Fahey, 1993a)

As misturas salínica (**Tabela 2**) e vitamínica (**Tabela 3**) foram preparadas de acordo com as recomendações do Instituto de Nutrição para camundongos adultos (Reeves, Nielsen *et al.*, 1993).

Tabela 2. Composição da mistura salínica da ração hiperlipídica.

Sais minerais	g/Kg de Mix
Carbonato de cálcio anidro	357,0
Fosfato de potássio monobásico	250,0
Cloreto de sódio	74,0
Citrato de potássio	28,0
Sulfato de potássio	46,6
Óxido de magnésio	24,0
Citrato férrico	6,06
Carbonato de zinco	1,65
Carbonato de manganês	0,63
Carbonato cúprico	0,3
Iodato de potássio	0,01
Selenato de sódio anidro	0,01025
Paramolibdato de amônio tetrahidratado	0,00795
Meta-silicato de sódio 9-hidratado	1,45
Sulfato de potássio e crômio	0,275
Cloreto de lítio	0,0174
Ácido bórico	0,0815
Fluoreto de sódio	0,0635
Carbonato de níquel	0,0318
Vanadato de amônio	0,0066
Sacarose	209,8

Composição da mistura salínica para as dietas de acordo com o Instituto Americano de Nutrição (Reeves, Nielsen e Fahey, 1993a)

Tabela 3. Composição da mistura vitamínica da ração hiperlipídica.

Vitaminas	(g/Kg de mix)
Ácido nicotínico	3,00
Pantotenato de cálcio	1,60
Piridoxina-HCl	0,70
Tiamina-HCl	0,60
Riboflavina	0,60
Ácido fólico	0,20
D-biotina	0,02
Vitamina B-12	2,50
Vitamina E	15,00
Vitamina A	0,80
Vitamina D ₃	0,25
Vitamina K	0,075
Sacarose	974,655

Composição da mistura vitamínica para as dietas de acordo com o Instituto Americano de Nutrição (Reeves, Nielsen e Fahey, 1993a)

3.1.2.2 Modelo de síndrome metabólica

O modelo de síndrome metabólica foi realizado pela mestre Jaqueline Cavalcante Silva do Laboratório de Bioquímica Clínica FCF/USP orientada pela Profa. Titular Dulcineia S.P. Abdalla. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/FCF/377) em 03/12/2012 e pelo Comitê de Interno de Biossegurança em 03/07/2012 (**Anexo 5**).

Para o modelo de síndrome metabólica foram utilizados camundongos C57BL/6J machos, de aproximadamente 90 dias, provenientes do Biotério do Conjunto das Químicas da USP, onde estes passaram por adaptação durante 1 semana, sendo distribuídos em grupos que receberam ração hiperlipídica e ração controle durante 20 semanas (**Tabela 4**). Os camundongos foram mantidos em gaiolas controladas com a temperatura de 20 ± 2 °C em ciclo de 12 horas claro/escuro com umidade relativa de 55 a 65%.

O soro foi coletado dos camundongos após 20 semanas de alimentação com RH. As amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm, 4 °C e em seguida armazenadas a -80 °C.

Tabela 4. Composição das rações controle e hiperlipídica do modelo síndrome metabólica

Perfil (%)	Controle (%)	Hiperlipídica (%)
Proteína	24,0	20,5
Lipídeos	4,00	36,0
Carboidratos	68,0	36,2
Fibras	4,0	0,0
Umidade	<10	<10
Cinzas	3,5	3,5
Sais minerais (g/kg)		
Cálcio	5,60	7,40
Cloreto	0,86	1,14
Cobre (mg/kg)	3,6	4,78
Cromo (mg/kg)	0,41	0,54
Fluoreto (mg/kg)	11,00	14,63
Iodo (mg/kg)	0,31	0,412
Ferro (mg/kg)	40,80	54,26
Magnésio	0,49	0,65
Manganês	46,70	62,11
Fosforo	5,80	7,71
Potássio	5,60	7,44
Selênio (mg/kg)	0,21	0,27
Sódio (mg/kg)	571,00	759,43
Enxofre (mg/kg)	668,00	888,44
Zinco (mg/kg)	21,60	28,72

Vitaminas		
Colina	1148,00	1526,84
Acido fólico	0,75	0,99
Acido pantotênico	5,50	7,31
Niacina	15,00	19,95
Piroxidina	4,10	5,45
Riboflavina	2,30	3,05
Tiamina	3,00	3,99
Vitamina B-12	40,00	53,20
Vitamina E UI/kg	25,70	34,181
Vitamina A UI/kg	3162,00	4205,46
Vitamina D ₂ UI/kg	1000,00	1300,00
Vitamina K ₃ (menadiona)	0,52	0,6
Carboidratos (g/kg)		
Monossacarídeos	1,9	1,0
Dissacarídeos	456,5	243,0
Polissacarídeos	212,3	113,0
Ácidos graxos (g/kg)		
C18:2 linoleico	4,1	36,6
C18:3 Linolênico	0,4	3,6
Total saturado	15,7	141,0
Total monoinsaturado	18,0	162,0
Total poliinsaturado	4,5	40,2

Continuação		
Aminoácidos (g/kg)		
Alanina	6,2	5,3
Arginina	8,5	7,3
Acido aspártico	15,0	12,8
Cistina	0,7	0,6
Acido glutâmico	47,5	40,6
Glicina	5,7	4,9
Histidina	6,4	5,5
Isoleucina	12,9	11,0
Leucina	19,4	16,6
Lisina	17,3	14,8
Metionina	8,3	7,1
Fenilalanina	10,4	8,9
Prolina	24,0	20,5
Serina	10,2	8,7
Treonina	10,2	8,7
Triptofano	2,6	2,2
Tirosina	13,3	11,4
Valina	15,2	13,0

A ração foi baseada nas recomendações de 1993 do Instituto de Nutrição para camundongos adultos (Reeves, Nielsen e Fahey, 1993b) adaptada conforme Ding *et al*, 2012.

Para a caracterização do modelo de síndrome metabólica há alguns parâmetros pré-estabelecidos. Dentre essas características estão o aumento de

massa (g), a hiperglicemia, a hiperinsulinemia e a hiperleptinemia, além da resistência à leptina e a diminuição de adiponectina descritas na **Tabela 5**.

Tabela 5. Características dos camundongos grupo controle e hiperlipídico com síndrome metabólica, após 20 semanas de dieta.

	Controle (N=5)	Hiperlipídico (N=5)	P valor
Glicose basal (mg/ dL)	145,4 (±6,46)	213,8(±16,42)	p<0,001
Massa final (g)	24,83 (± 1,56)	39,29 (± 1,26)	p<0,001
Curva glicêmica (AUC)	19007(±2060,26)	32364(±2166,40)	p<0,001
KITT (%)¹	0,016(±0,004)	0,004(±0,002)	p<0,05
Insulina (ng/ mL)	1,42(±0,36)	9,71(±1,54)	p<0,001
Leptina (ng/ mL)	23,29(±10,64)	*122,53	p<0,001
Adiponectina (ng/ mL)	3,61(±0,26)	0,24(±0,32)	p<0,001

1. K_{ITT} - constante de taxa de decaimento de glicose: a medida da constante de desaparecimento da glicose do plasma após a injeção IV de insulina (teste de tolerância à insulina - ITT), ou KITT.

3.2 Quantificação de Quinurenina

3.2.1 Extração de Quinurenina

3.2.1.1 Protocolo utilizando solvente metanol (Chen *et al.*, 2008) para extração de Quin das amostras de fígados provenientes de camundongos C57BL/6J dos modelos RS 15 d, PSP 72 h e PR 24 h para análise em HPLC

As amostras de fígado (massa próxima a 1 g) oriundas de camundongos C57BL/6J foram maceradas em 1 mL de solução tampão fosfato (PBS 1x) com o macerador (modelo EQ36/Marconi Equipamentos/Brasil) e, em seguida, as amostras foram agitadas por 1 minuto. Posteriormente, 500 µL do macerado foram condicionados com 1,5 ml de solvente (metanol) e agitadas por mais 1 min. Os microtubos foram acondicionados a -20°C por 1 h. Após esse período, os microtubos foram centrifugados por 15 min a 4°C em 15.000 rpm. Os sobrenadantes foram retirados e filtrados em colunas Phre free phospholipids Fenomenex® para retirar fosfolipídios e proteínas. As amostras foram transferidas para tubos de vidro e secas em fluxo de nitrogênio. Em seguida, as amostras foram ressuspensas com 100 µL água Milli-Q®. O volume foi retirado e transferido para filtro Spin-X, 22 µm (Costar®, Corning, Estados Unidos) e centrifugados por 3 min a 2000 rpm. Os sobrenadantes foram acondicionados nos tubos de injeção e 40 µL foram injetados no cromatógrafo.

3.2.1.2 Protocolo utilizando solvente acetonitrila para extração de Quin das amostras de plasma de ratos Wistar provenientes dos modelos PSP 24, 48, 72 e 96 h e PR 48 e 72 h para análise em HPLC

Para análise de Trp e Quin em soro de ratos, utilizamos o volume de 400 µL do soro de ratos Wistar para a extração de Quin e Trp. Nos microtubos de 2 mL, as amostras de plasma de ratos foram adicionadas aos microtubos contendo 1,5 mL de acetonitrila gelada (Merck, Estados Unidos). Os microtubos foram acondicionados a

-20°C por 1 h. Após esse período, os microtubos foram centrifugados por 15 min a 4°C em 15.000 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para um tubo de ensaio de vidro e secos por fluxo contínuo de gás nitrogênio. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em 150 µL água Milli-Q® e os tubos foram centrifugados. O volume foi retirado e transferido para filtro Spin-X, 22 µm (Costar®, Corning, Estados Unidos) e centrifugados por 3 min a 2.000 rpm. O filtrado foi utilizado para análise por cromatografia líquida de alta eficiência, onde foram injetados 40 µL da amostra.

3.2.1.3 Protocolo utilizando solvente acetonitrila para extração de Quin com amostras de soro provenientes de camundongos C57BL/6J dos modelos RS 15 dias, PSP 72 h e PR 24 h para análise em LC-MS

O soro (50 µL) foi adicionado a um tubo contendo 1,5 mL de acetonitrila e centrifugados por 1 min. Após a adição da amostra, 10 µL de uma solução estoque de padrão interno contendo 417,9 nM melatonina deuterada (MELATONINA-D7), 5 µM triptofano metil ester (TME) e 5 µM D₂ ácido 5- hidroxindolacético deuterado 2 (HIAA-D2) em metanol. Esses microtubos foram centrifugados por 1 min e armazenados por 1 h a - 20°C para total precipitação das proteínas. Os microtubos foram submetidos à centrifugação a 10000 rpm por 10 min a 4 °C. O sobrenadante dos microtubos foi separado e filtrado em coluna em placa Phree free Phospholipid Removal (Phenomenex, EUA) para remoção de proteínas e fosfolípidos da amostra. As amostras foram transferidas para um tubo de vidro e secas sob atmosfera de gás nitrogênio, sendo reconstituídas em 10 µL de uma mistura de água:metanol (9:1) contendo 0.1% de ácido fórmico.

3.2.2 Instrumentação analítica de Quinurenina

3.2.2.1 Instrumentação analítica do HPLC

O método utilizado para quantificação de Trp e Quin por HPLC foi previamente descrito (Moreno *et al.*, 2013; Tourino *et al.*, 2013). A quantificação de Trp e Quin ocorreu na mesma corrida cromatográfica por cromatografia líquida de alta eficiência no equipamento Shimadzu SCL-10A vp (Shimadzu Corporation). A cromatografia foi realizada em coluna Synergi C18 Phenomenex, (Fusion-RP, 150 x 4.60 mm, 4 μ m, 80Å) em um gradiente de concentração variável de H₂O: ACN (**Tabela 6**). Foi utilizado controladora SCL-10A VIP, injetor automático SIL-10AF, 2 bombas LC-10A VP e degaseificador DGV-14A para este método.

O método cromatográfico foi realizado em um gradiente de eluição com ACN (A) e água MilliQ (Millipore) (B). O gradiente de eluição utilizado foi: (i) 0 – 0,01 min 0(A):100(B) (v/v); (ii) 0,01 – 22.00 min (10(A):90(B)), (v/v); (iii) 22.00 – 25.00 min ((0(A):100(B) – 100(A):0(B)), (v/v); (iv) 25.00 – 35.00 min (0(A):100(B)).

Os analitos de interesse foram identificados por detectores de arranjo de diodo (*diode array*) SPDM 10A VP nos comprimentos de onda de 280 nm e 365 nm para Trp e Quin, respectivamente. As áreas de Trp e Quin (**Figura 3**) foram extraídas do programa Class-VP (Shimadzu®).

Figura 3. Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD. (A) o pico de Trp no tempo de retenção de 21 min ($\lambda = 280$ nm) e (B) de quinurenina (Quin) no tempo de retenção de 14 min ($\lambda = 365$ nm).

Curvas padrão foram realizadas previamente aos experimentos para a quantificação de concentração de Quin e Trp e foram aplicadas juntamente com as amostras no equipamento, de acordo com a linearidade já descrita para o método (Moreno *et al.*, 2013; Tourino *et al.*, 2013) Uma curva padrão é apresentada na **Figura 11**. Os limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) obtidos foram baseados na relação Sinal/Ruído (S/R, maior ou igual a 3 para LOD e maior ou igual a 10 para LOQ), a partir das curvas de calibração calculados pelo programa Class vp (Shimadzu). Foram obtidas as seguintes concentrações de LOD, 227 nM e 194,3 nM e para LOQ, 0,932 μ M e 1,007 μ M para Quin e Trp, respectivamente.

Figura 4. Curva padrão de Quin (1) e de Trp (2) realizado por HPLC-DAD.

3.2.2.2 Instrumentação analítica do LC-MS

Utilizamos a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) para as análises de soro de camundongos restritos de sono (15 d), privados de sono (72 h) e período rebote (24 h). O instrumento empregado 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 de monitoramento de múltipla reação (MRM). Os íons precursor e produto para os analitos de interesse estão apresentados na **Tabela 6**. Outros parâmetros utilizados na análise foram: capilar a

3.500 V, temperatura do gás: 250 °C, vazão do gás: 5 L.min⁻¹, nebulizador: 45 psi, temperatura do gás: 200 °C e voltagem da agulha: 500 V.

Tabela 6. Relação de m/z dos metabólitos no LC-MS.

Metabolitos	Íon precursor	Íon produto	Fragmentador	Energia de colisão (E.C)
Trp	205	146	74	10
P. I. (Trp) ¹	219	160	41	15
Quin	209	94	79	14
P. I (Quin) ²	194	148	80	22

1. Padrão interno (P.I) do Trp - TME (Tryptofano metil ester)

2. Padrão interno (P.I) da Quin - HIAA-D₂ ácido 5- hidrox-indolacetico D2

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 μ L e a vazão utilizada durante toda a cromatografia foi de 0.2 mL.min⁻¹ na coluna Luna C18(2) (150 mm x 2 mm, 3 μ 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.

Também foram utilizadas curvas padrão para a quantificação de concentração de Trp e Quin no LC-MS/MS. Essa metodologia foi completamente validada de acordo com o proposto pela legislação vigente para métodos bioanalíticos (RDC 27, de 17 de maio de 2012) pela aluna de doutorado Ariane Rivellis Julio sob orientação do prof. Dr. Ernani Pinto, que aceitaram colaborar do presente estudo e realizam as análises e a quantificação dos analitos de interesse desse trabalho.

3.2.3 Recuperação

Para avaliar os procedimentos de extração utilizados, as amostras de fígado e soro de camundongos foram contaminadas com diferentes concentrações de Trp e Quin para avaliação da recuperação do procedimento de extração. Todas as amostras apresentaram recuperação acima de 80%.

3.2.4 Análises estatísticas

A análise de resultados foi feita pelo programa GraphPAD Prism[®] 5.03. Os testes estatísticos foram realizados por test T student e ANOVA de uma via com pós-teste de Newmann- Keuls. As barras representam a média $\pm$ erro padrão. As diferenças apresentam $p < 0,05$ (ANOVA).

4. Resultados e Discussão

4.1 Quantificação de Trp e Quin em modelo de restrição de sono em camundongos

4.1.1 Quantificação de Trp e Quin hepática

No estudo das concentrações de Trp e Quin do fígado de camundongos restritos de sono não foram observadas alterações em nenhum grupo do estudo (RS PSP, PR) (**Figura 5**).

No fígado, é largamente descrita a produção de nicotinamida dinucleotídeo (NAD) pela via das quinureninas de degradação de Trp (Keszthelyi, Troost e Masclee, 2009). A restrição de sono em indivíduos altera perfis lipídico, proteico e energético, podendo estar relacionada com o desenvolvimento de algumas doenças, como a *diabetes mellitus* (Bell *et al.*, 2013). Zimberg e colaboradores (2012) mostraram que a RS pode causar resistência insulínica no fígado. A resistência à insulina está associada com obesidade e hipertensão. Dentre os mecanismos causadores da resistência insulínica, acredita-se que a desregulação das concentrações de Trp e Quin possa estar envolvida, entretanto os mecanismos metabólicos relacionados precisam ser mais estudados (Oxenkrug, 2013). Demonstramos que Trp e Quin provavelmente não estão envolvidas com as diversas alterações metabólicas encontradas no tecido hepático.

Figura 5. (A) Quantificação de quinurenina em fígado de camundongos machos C57B/6 nos grupos controle (n=15), modelos de 15 dias de restrição de sono (RS) (n=12), 72 h privação de sono (n=17) e 24 h de período rebote (PR) (n=14). (B) Razão quinurenina e triptofano (Razão Quin/Trp) no fígado dos modelos restrição de sono (RS), privação de sono paradoxal (PSP) e período rebote (PR).

4.1.2 Quantificação de Trp e Quin sérica

A quantificação de Trp e Quin no soro dos camundongos machos C57BL/6J nos modelos restrição de sono (RS) de 15 dias, privação de sono paradoxal (PSP) 72 h e período rebote (PR) de 24 h foi realizada por LC-MS/MS devido ao método apresentar maior sensibilidade.

De início, comparamos as concentrações séricas de Quin e Trp dos camundongos do presente estudo com os valores da literatura que são, 1,467 μM para camundongos Balb/C (Jrad-Lamine *et al.*, 2011) e aproximadamente 1,5 μM para C57BL/6J (Metz *et al.*, 2014).

Não foram observadas diferenças significativas das concentrações de Trp e Quin entre os grupos controle, RS, PSP e PR (**Figura 6**).

Um estudo realizado em indivíduos restritos de sono mostrou a alteração do metabolismo de Trp sérico com aumento de triptofano, serotonina e melatonina (Bell

et al., 2013), corroborando estudos anteriores que mostram forte papel da serotonina na indução do sono (Rosenthal, 1998). A síntese de melatonina é a chave para a indução do sono e é secretada pela glândula pineal com função no ciclo vigília-sono (Claustrat, Brun e Chazot, 2005; Pandi-Perumal *et al.*, 2006). Conforme apresentado, além do aumento de serotonina e melatonina, pacientes RS e PSP apresentaram aumento da disponibilidade de Trp (Davies *et al.*, 2014). Apesar disso, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de Trp e Quin sérica nos modelos do estudo.

Figura 6. (A) Quantificação de quinurenina (Quin) sérica dos modelos de restrição de sono (RS). Os camundongos machos C57BL/6J foram separados em controle (n=14), 15 dias de RS (n=12), 72 h de PSP (n=13) e 24 h de período de rebote (PR) (n=12). (B) Razão quinurenina e triptofano (Razão Quin/Trp) sérica dos modelos restrição de sono (RS), privação de sono paradoxal (PSP) e período rebote (PR).

Apesar dos resultados obtidos não demonstrarem diferença, já foi descrito um aumento da disponibilidade de aminoácidos em animais submetidos ao modelo de RS, como por exemplo, o aumento de Trp (Davies *et al.*, 2014). O acúmulo de Trp favoreceria principalmente a síntese de Quin. Diferentemente do grupo RS, a concentração de Quin sérica e hepática diminuiriam o grupo PSP quando se compara com grupo RS. Essa diminuição seria resultante do estresse agudo que o

animal sofreria. Estudo em ratos Wistar privados de sono total por 5 dias mostrou perda de função hepática grave e baixos níveis de fosfatidilcolina. A depleção de fosfatidilcolina representa perda de membrana celular e marcador de reações de estresse oxidativo. A lesão nos hepatócitos durante a privação de sono total é grave mas reversível (Zhang *et al.*, 2006). No período rebote, ocorreria a recuperação hepática e aumento da disponibilidade de Trp desse grupo quando comparado com o grupo privado de sono paradoxal.

4.2 Modelos privação de sono paradoxal (PSP) e privação de sono paradoxal seguido por período rebote (PR) em ratos

4.2.1 Quantificação de Trp e Quin plasmática

No intuito de comparar as concentrações plasmáticas de Quin e Trp dos nossos ratos com os valores da literatura, fizemos um levantamento bibliográfico e encontramos valores: $1,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$ (Kucharewicz *et al.*, 2008) e $1,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (Pawlak *et al.*, 2003) nos grupos controle de modelos experimentais de asma e falência renal. No nosso estudo, obtivemos concentração de Quin plasmática no grupo controle: $2,398 \pm 1,66 \mu\text{M}$.

Em relação aos modelos de privação do sono (PSP) e período rebote (PR) em ratos Wistar, não houve diferença estatística entre as concentrações de Quin nos grupos estudados: PSP 24 h, 48 h, 72 h e 96 h (**Figura 7**). A razão Quin/Trp seguiu um perfil semelhante ao da produção de Quin, demonstrando as concentrações de Trp plasmáticas também não variaram de forma significativa.

Figura 7. (A) Quantificação de quinurenina (Quin) plasmáticas de ratos Wistar. Foram avaliados os grupos controle (n=8), privação de sono paradoxal (PSP) de 24 (n=8), 48 (n=8), 72 (n=7) e 96 (n=8) e período rebote (PR) de 48h (n=6) e 72h (n=7). (B) Razão quinurenina e triptofano (Razão Quin/Trp) de plasma nos modelos restrição de sono (RS), privação de sono paradoxal (PSP) e período rebote (PR).

4.3 Modelos de obesidade induzida por ração hiperlipídica em camundongos

4.3.1 Quantificação de Trp e Quin hepática

No nosso estudo, obtivemos concentrações de Quin: $34,71 \pm 12,50$ nmol/ g de tecido e $39,76 \pm 18,09$ nmol/ g de tecido no grupo controle e grupo que recebeu ração hiperlipídica, respectivamente, não sendo observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 15). Os nossos valores de Quin foram superiores as concentrações observadas em Kolodziej e colaboradores (2013) que foi de $13,92 \pm 1,94$ nmol/ g de tecido nos animais DBA/2.

Estudos demonstraram que o excesso de gordura e carboidratos na dieta de camundongos pode induzir esteatose hepática. Esse fenômeno poderia contribuir para a alteração do metabolismo do Trp (Osawa *et al.*, 2011; Nagano *et al.*, 2013).

Nossos resultados demonstram que essa hipótese não parece ser válida, já que não foram observadas diferenças entre os grupos estudados.

Figura 8. (A) Quantificação de quinurenina (Quin) hepática do grupo controle e do grupo ração hiperlipídica (os animais receberam a ração hiperlipídica por 10 semanas) estabelecidos no modelo de ração hiperlipídica (RH). (B) Razão de quinurenina/triptofano (Quin/Trp) do grupo RH e grupo controle do modelo experimental RH (n=3).

4.4 Modelos de Síndrome Metabólica em camundongos

4.4.1 Quantificação Quin e Trp sérica

No modelo de síndrome metabólica, a quantificação de Quin foi realizada no soro de camundongos machos que se alimentaram durante 20 semanas com ração hiperlipídica. É descrito que os distúrbios no metabolismo do Trp estão relacionados com síndrome metabólica em indivíduos obesos (Mangge *et al.*, 2014) e resistência insulínica em pacientes diabéticos (Oxenkrug, 2010a). Contudo, não foram observadas diferenças na concentração de Quin entre os grupos controle e camundongos com síndrome metabólica. Embora não existam diferenças significativas da concentração de Quin entre grupos controle e síndrome metabólica

($p=0,055$), parece haver uma tendência à diminuição da concentração de Quin neste grupo quando comparados com o grupo controle (**Figura 9**).

Um estudo realizado com jovens obesos com e sem síndrome metabólica demonstrou um aumento das concentrações de Quin sérica (Mangge *et al.*, 2014). Adicionalmente, Godefroy e colaboradores (2013) mostraram que camundongos obesos com síndrome metabólica tendem a apresentar menor concentração de Quin. Entretanto, o autor empregou o método de LC-MS para a análise.

Figura 9. (A) Quantificação de quinurenina (Quin) sérica do modelo de síndrome metabólica (SM). (B) Razão de quinurenina por triptofano (Quin/Trp) do modelo de síndrome metabólica ($n=5$).

5. Conclusão

É bem conhecida a relação entre restrição de sono e obesidade e alterações na resposta inflamatória. Sabendo que a catálise de triptofano (Trp) a quinurenina (Quin) também um fator importante para a modulação do sistema imunológico, os objetivos deste trabalho foram avaliar as concentrações de Quin e Trp em fígado e soro de camundongos e ratos submetidos à restrição de sono e dieta hiperlipídica. Porém, em nenhum dos grupos estudados foram observadas alterações das concentrações de Trp e Quin nos modelos do estudo, sugerindo que a modulação imunológica nesses quadros patológicos não haja contribuição de Quin e Trp.

6. Referências

Aballay, L. R. et al. Overweight and obesity: a review of their relationship to metabolic syndrome, cardiovascular disease, and cancer in South America. **Nutr Rev**, v. 71, n. 3, p. 168-79, Mar 2013. ISSN 1753-4887. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23452284> >.

Ball, H. J. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 3, p. 467-471, Mar 2009. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263195800006 >.

Bell, L. N. et al. Effects of sleep restriction on the human plasma metabolome. **Physiology & Behavior**, v. 122, p. 25-31, Oct 2 2013. ISSN 0031-9384. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000329552700004 >.

Besedovsky, L.; Lange, T.; Born, J. Sleep and immune function. **Pflugers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 463, n. 1, p. 121-137, Jan 2012. ISSN 0031-6768. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000299152600012 >.

Bollinger, T. et al. Sleep, immunity, and circadian clocks: a mechanistic model. **Gerontology**, v. 56, n. 6, p. 574-80, 2010. ISSN 1423-0003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20130392> >.

Braidy, N. et al. Changes in kynurenine pathway metabolism in the brain, liver and kidney of aged female Wistar rats. **Febs Journal**, v. 278, n. 22, p. 4425-4434, Nov 2011. ISSN 1742-464X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000297155600025 >.

Brandacher, G. et al. Chronic immune activation underlies morbid obesity: is IDO a key player? **Curr Drug Metab**, v. 8, n. 3, p. 289-95, Apr 2007. ISSN 1389-2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17430117> >.

Breum, L. et al. Twenty-four-hour plasma tryptophan concentrations and ratios are below normal in obese subjects and are not normalized by substantial weight reduction. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 5, p. 1112-1118, May 2003. ISSN 0002-9165. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182521200005 >.

Bryant, P. A.; Trinder, J.; Curtis, N. Sick and tired: Does sleep have a vital role in the immune system? **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 6, p. 457-67, Jun 2004. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15173834> >.

Cancello, R. et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery induced weight loss. **Diabetes**, v. 54, n. 8, p. 2277-2286, Aug 2005. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000230869500002 >.

Catalán, V. et al. Adipose tissue immunity and cancer. **Front Physiol**, v. 4, p. 275, 2013. ISSN 1664-042X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24106481> >.

Cherayil, B. Indoleamine 2,3-dioxygenase in intestinal immunity and inflammation. **Inflamm Bowel Dis**, v. 15, n. 9, p. 1391-6, Sep 2009. ISSN 1536-4844. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19322906 >.

Choi, S. H.; Ginsberg, H. N. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 22, n. 9, p. 353-363, Sep 2011. ISSN 1043-2760. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000294986700002 >.

Claustrat, B.; Brun, J.; Chazot, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Medicine Reviews**, v. 9, n. 1, p. 11-24, Feb 2005. ISSN 1087-0792. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000227031500004 >.

Davies, S. K. et al. Effect of sleep deprivation on the human metabolome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 29, p. 10761-10766, Jul 2014. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000339310700080 >.

Dolusic, E. et al. Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) Inhibitors. 3-(2-(Pyridyl)ethenyl)indoles as Potential Anticancer Immunomodulators. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 15, p. 5320-5334, Aug 11 2011. ISSN 0022-2623. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000293419400005 >.

Flegal, K. M. et al. Prevalence and Trends in Obesity Among US Adults, 1999-2008. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 303, n. 3, p. 235-241, Jan 20 2010. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273690600019 >.

Forouhar, F. et al. Molecular insights into substrate recognition and catalysis by tryptophan 2,3-dioxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 2, p. 473-478, Jan 9 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243445400015 >.

Gale, D. P.; Maxwell, P. H. The role of HIF in immunity. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 4, p. 486-494, Apr 2010. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000276324300004 >.

Godefroy O.P., *et al.*, Induction of TDO2 and IDO2 in Liver by High-Fat Feeding in Mice: Discrepancies with Human Obesity, **International Journal of Tryptophan Research**, (Suppl. 1), p.29–37, Jun 2013, 10.4137/IJTR.S11717;

IBGE, **Os Números da Obesidade no Brasil: VIGITEL (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico) 2009 e POF (Pesquisa de Orçamentos Familiares) 2008-2009**, Instituto de Geografia e Estatística, 2010.

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 2005. ISSN 0306-9877. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000228107500007 >.

Jouvet, D. et al. ETUDE DE LA PRIVATION SELECTIVE DE LA PHASE PARADOXALE DE SOMMEIL CHEZ LE CHAT. **Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales**, v. 158, n. 4, p. 756-&, 1964 1964. ISSN 0037-9026. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A19649449A00037 >.

Jrad-Lamine, A. et al. Deficient Tryptophan Catabolism along the Kynurenine Pathway Reveals That the Epididymis Is in a Unique Tolerogenic State. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 10, p. 8030-8042, Mar 11 2011. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000288013300034 >.

Ju, S. Y.; Choi, W. S. Sleep duration and metabolic syndrome in adult populations: a meta-analysis of observational studies. **Nutr Diabetes**, v. 3, p. e65, 2013. ISSN 2044-4052. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23670223> >.

Katz, J. B.; Muller, A. J.; Prendergast, G. C. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. **Immunol Rev**, v. 222, p. 206-21, Apr 2008. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18364004> >.

Keszthelyi, D.; Troost, F.; Masclee, A. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. **Neurogastroenterol Motil**, v. 21, n. 12, p. 1239-49, Dec 2009. ISSN 1365-2982. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19650771 >.

King, N. J.; Thomas, S. R. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 12, p. 2167-72, 2007. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320464> >.

Kojima, C. et al. Adipocytokines in childhood cancer survivors and correlation with metabolic syndrome components. **Pediatrics International**, v. 55, n. 4, p. 438-442, Aug 2013. ISSN 1328-8067. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000322711600016 >.

Kolodziej, L. Systemic metabolism of tryptophan and its catabolites, kynurenine and 3-HAA, in mice with inflammatory arthritis. **Gene**, v. 512, n. 1, p. 23-27, Jan 2013. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000312759200004 >.

Kucharewicz, I. et al. The concentration of kynurenine in rat model of asthma. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 46, n. 2, p. 199-203, 2008. ISSN 1897-5631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18519238> >.

Li, J. S. et al. Biochemical mechanisms leading to tryptophan 2,3-dioxygenase activation. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 64, n. 2, p. 74-87, Feb 2007. ISSN 0739-4462. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243716800002 >.

Louie, S. M.; Roberts, L. S.; Nomura, D. K. Mechanisms linking obesity and cancer. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 10, p. 1499-1508, Oct 2013. ISSN 1388-1981. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000324719700002 >.

Lumeng, C. N. et al. Phenotypic Switching of Adipose Tissue Macrophages With Obesity Is Generated by Spatiotemporal Differences in Macrophage Subtypes. **Diabetes**, v. 57, n. 12, p. 3239-3246, Dec 2008. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000261312800011 >.

Machado, R. B. et al. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. **Brain Research**, v. 1004, n. 1-2, p. 45-51, Apr 9 2004. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000220822300005 >.

Machado, R. B.; Suchecki, D.; Tufik, S. Sleep homeostasis in rats assessed by a long-term intermittent paradoxical sleep deprivation protocol. **Behav Brain Res**, v. 160, n. 2, p. 356-64, May 2005. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863232> >.

Mangge, H. et al. Obesity-related dysregulation of the Tryptophan-Kynurenine metabolism: Role of age and parameters of the metabolic syndrome. **Obesity**, v. 22, n. 1, p. 195-201, Jan 2014. ISSN 1930-7381. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000329613600029 >.

Manzar D., *et al.*, Sleep-immune system interaction: advantages and challenges of human sleep loss model, **Frontiers in Neurology**, v. 3, a. 2, p.3, Jan 2012, doi: 10.3389/fneur.2012.00002;

Maragno-Correa, J. M. et al. Sleep deprivation increases mortality in female mice bearing Ehrlich ascitic tumor. **Neuroimmunomodulation**, v. 20, n. 3, p. 134-40, 2013. ISSN 1423-0216. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23428661> >.

Mellor, A. L.; Munn, D. H. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? **Immunology Today**, v. 20, n. 10, p. 469-473, Oct 1999. ISSN 0167-5699. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000082880200009 >.

Mellor, A. L.; Munn, D. H. IDO expression by dendritic cells: Tolerance and tryptophan catabolism. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 10, p. 762-774, Oct 2004. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000224245600012 >.

Metz, R. et al. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. **Cancer Res**, v. 67, n. 15, p. 7082-7, Aug 2007. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671174> >.

Metz, R. et al. IDO2 is critical for IDO1-mediated T-cell regulation and exerts a non-redundant function in inflammation. **International Immunology**, v. 26, n. 7, p. 357-367, Jul 2014. ISSN 0953-8178. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000339420800001 >.

Milner, J. J.; Beck, M. A. The impact of obesity on the immune response to infection. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 2, p. 298-306, May 2012. ISSN 0029-6651. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000303823000011 >.

Moffett, J. R.; Namboodiri, M. A. Tryptophan and the immune response. **Immunology and Cell Biology**, v. 81, n. 4, p. 247-265, Aug 2003. ISSN 0818-9641. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000184042600002 >.

Moldofsky, H. SLEEP AND THE IMMUNE-SYSTEM. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 17, n. 8, p. 649-654, Aug 1995. ISSN 0192-0561. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995RZ20300005 >.

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; 1742-4658. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000327130600006 >.

Nagano, J. et al. Effects of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Deficiency on High-Fat Diet-Induced Hepatic Inflammation. **Plos One**, v. 8, n. 9, Sep 9 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000326405300071 >.

Nieman, K. M. et al. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 10, p. 1533-1541, Oct 2013. ISSN 1388-1981. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000324719700005 >.

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 >.

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 1476-4687. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21976023> >.

Osawa, Y. et al. L-Tryptophan-mediated Enhancement of Susceptibility to Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Dependent on the Mammalian Target of Rapamycin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 40, p. 34800-34808, Oct 2011. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000295406300034 >.

Oxenkrug, G. Insulin Resistance and Dysregulation of Tryptophan-Kynurenine and Kynurenine-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Metabolic Pathways. **Molecular Neurobiology**, v. 48, n. 2, p. 294-301, Oct 2013. ISSN 0893-7648. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000324640600005 >.

Oxenkrug, G. F. Metabolic syndrome, age-associated neuroendocrine disorders, and dysregulation of tryptophan-kynurenine metabolism. In: Andrews, R. J.;Slikker, W., et al (Ed.). **Neuroprotective Agents**, v.1199, 2010a. p.1-14. (Annals of the New York Academy of Sciences). ISBN 0077-8923

978-1-57331-777-1.

Oxenkrug, G. F. Tryptophan-Kynurenine Metabolism as a Common Mediator of Genetic and Environmental Impacts in Major Depressive Disorder: The Serotonin Hypothesis Revisited 40 Years Later. **Israel Journal of Psychiatry and Related Sciences**, v. 47, n. 1, p. 56-63, 2010 2010b. ISSN 0333-7308. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000282933400007 >.

Pandi-Perumal, S. R. et al. Melatonin - Nature's most versatile biological signal? **Febs Journal**, v. 273, n. 13, p. 2813-2838, Jul 2006. ISSN 1742-464X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000238354600001 >.

Patel S.P., *et al.*, The Role of the Immune System in Obesity and Insulin Resistance, *Review Article, Journal of Obesity*, p. 9, 2013, /dx.doi.org/10.1155/2013/616193;

Pawl, J. D. *et al.* Sleep loss and its effects on health of family caregivers of individuals with primary malignant brain tumors. **Res Nurs Health**, v. 36, n. 4, p. 386-99, Aug 2013. ISSN 1098-240X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23633116> >.

Pawlak, D. *et al.* Peripheral distribution of kynurenine metabolites and activity of kynurenine pathway enzymes in renal failure. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 54, n. 2, p. 175-189, Jun 2003. ISSN 0867-5910. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000183918100004 >.

Perez de Heredia, F.; Gomez-Martinez, S.; Marcos, A. Obesity, inflammation and the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 2, p. 332-338, May 2012. ISSN 0029-6651. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000303823000015 >.

Porkka-Heiskanen, T.; Zitting, K. M.; Wigren, H. K. Sleep, its regulation and possible mechanisms of sleep disturbances. **Acta Physiologica**, v. 208, n. 4, p. 311-328, Aug 2013. ISSN 1748-1708. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000321695000006 >.

Prendergast, G. C. Immune escape as a fundamental trait of cancer: focus on IDO. **Oncogene**, v. 27, n. 28, p. 3889-900, Jun 2008. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18317452> >.

Prendergast, G. C. CANCER Why tumours eat tryptophan. **Nature**, v. 478, n. 7368, p. 192-194, Oct 13 2011. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000295782800037 >.

Prendergast, G. C.; Metz, R.; Muller, A. J. Towards a genetic definition of cancer-associated inflammation: role of the IDO pathway. **Am J Pathol**, v. 176, n. 5, p. 2082-7, May 2010. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20228228> >.

Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, G. C. AIN-93 PURIFIED DIETS FOR LABORATORY RODENTS - FINAL REPORT OF THE AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION AD HOC WRITING COMMITTEE ON THE REFORMULATION OF THE AIN-76A RODENT DIET. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, Nov 1993a. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993MF52600025 >.

Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993b. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229312> >.

Ren, S.; Correia, M. A. Heme: a regulator of rat hepatic tryptophan 2,3-dioxygenase? **Arch Biochem Biophys**, v. 377, n. 1, p. 195-203, May 2000. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10775460> >.

Rosenthal, M. S. Physiology and neurochemistry of sleep. **American Journal of Pharmaceutical Education**, v. 62, n. 2, p. 204-208, Sum 1998. ISSN 0002-9459. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000075415300016 >.

Santos-Silva, R. et al. Increasing trends of sleep complaints in the city of Sao Paulo, Brazil. **Sleep Medicine**, v. 11, n. 6, p. 520-524, Jun 2010. ISSN 1389-9457. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000279424800004 >.

Schrocksadel, K. et al. Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. **Clinica Chimica Acta**, v. 364, n. 1-2, p. 82-90, Feb 2006. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000235376800008 >.

Sheridan, P. A. et al. Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 8, p. 1072-1077, Aug 2012. ISSN 0307-0565. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000307629500008 >.

Stefanovic-Racic, M. et al. Dendritic cells promote macrophage infiltration and comprise a substantial proportion of obesity-associated increases in CD11c(+) cells in adipose tissue and liver. **Diabetes**, v. 61, n. 9, p. 2330-2339, Sep 2012. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000308254100020 >.

Stenvinkel, P.; Zoccali, C.; Ikizler, T. A. Obesity in CKD-What Should Nephrologists Know? **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 24, n. 11, p. 1727-1736, Nov 2013. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000329911300006 >.

Stevens S. M., *et al.*, Normal Sleep, Sleep Physiology, and Sleep Deprivation, overview **Medscape**, 1188226 #aw2aab6b3, Dec 2011;

Sucher, R. et al. IDO-Mediated Tryptophan Degradation in the Pathogenesis of Malignant Tumor Disease. **Int J Tryptophan Res**, v. 3, p. 113-20, 2010. ISSN 1178-6469. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22084593> >.

Thomas, S. R.; Witting, P. K.; Drummond, G. R. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 10, p. 1713-65, Oct 2008. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18707220> >.

Toth, L. A.; Bhargava, P. Animal Models of Sleep Disorders. **Comparative Medicine**, v. 63, n. 2, p. 91-104, Apr 2013. ISSN 1532-0820. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000317320600001 >.

Tourino, M. C. et al. Tryptamine and dimethyltryptamine inhibit indoleamine 2,3 dioxxygenase 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 >.

Tufik, S. et al. Paradoxical sleep deprivation: neurochemical, hormonal and behavioral alterations. Evidence from 30 years of research. **An Acad Bras Cienc**, v. 81, n. 3, p. 521-38, Sep 2009. ISSN 1678-2690. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19722021> >.

Witkiewicz, A. K. et al. Genotyping and expression analysis of IDO2 in human pancreatic cancer: a novel, active target. **J Am Coll Surg**, v. 208, n. 5, p. 781-7; discussion 787-9, May 2009. ISSN 1879-1190. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19476837> >.

Wolowczuk, I. et al. Tryptophan metabolism activation by indoleamine 2,3-dioxygenase in adipose tissue of obese women: an attempt to maintain immune homeostasis and vascular tone. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 303, n. 2, p. R135-R143, Jul 2012. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000306424400002 >.

Zager, A. et al. Effects of acute and chronic sleep loss on immune modulation of rats. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, n. 1, p. R504-R509, Jul 2007. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000247970700058 >.

Zhang, Y. et al. Crystal structure and mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase, a heme enzyme involved in tryptophan catabolism and in quinolinate biosynthesis. **Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 145-155, Jan 9 2007. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243157300015 >.

Zimberg, I. Z. et al. Short sleep duration and obesity: mechanisms and future perspectives. **Cell Biochem Funct**, v. 30, n. 6, p. 524-9, Aug 2012. ISSN 1099-0844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22473743> >.

7. Anexos

Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais da UNIFESP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO/HOSPITAL SÃO PAULO	Data: 11-02-2012 08:16:33 Página 1/2 Id = 1153
São Paulo, 27 de Fevereiro de 2009 CEP 0144/09		
Ilmo(s). Sr(a). Pesquisador(a) Jair Ribeiro Chagas Co-Investigadores: Disciplina/Departamento Medicina e Biologia do Sono da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo Patrocinador Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP)		
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL		
Ref: Projeto de pesquisa intitulado: 'Avaliação das Alterações das Atividades de Metalopeptidases no Sistema Nervoso Central em Modelos de Privação de Sono'		
<p>CARACTERÍSTICA DO ESTUDO: Experimental, categoria C- estudo crônico</p> <p>OBJETIVOS: Desenvolver uma metodologia de estudo, utilizando substratos com supressão intramolecular de fluorescência e inibidores específicos para obter evidências de alterações de atividades proteolíticas em modelos de privação de sono. A partir dessas evidências, pretende-se estabelecer a correlação com os níveis de expressão das peptidases, por reação em cadeia da polimerase em tempo real.</p> <p>RESUMO: Estudo com 96 ratos Wistar provenientes do CEDEME-UNIFESP. Anestésico: ketamina e xilazina. Eutanásia: decapitação. Os animais serão submetidos à privação do sono paradoxal (PSP) usando o método da plataforma múltipla modificada. Os ratos serão distribuídos em 4 grupos: 1-grupo controle- mantidos na gaiola; 2- grupo privação de sono por 96 horas; 3- grupo rebote de privação de sono- os animais são submetidos à privação do sono por 96 horas e em seguida permitido dormir por 24 horas (grupo 3) e 48 horas (grupo 4). Ao final de cada experimento, os animais serão imediatamente sacrificados, os cérebros removidos e dissecados o estriado, hipocampo, hipotálamo, córtex frontal e tronco encefálico. As amostras serão homogenizadas e estocadas para análise da atividade enzimática. Será coletado sangue total. Serão determinadas as atividades enzimática para a hidrólise de peptídeos com fluorescência suprimida pelas enzimas ECA, TOP, neurolisina e NEP. Será realizada reação de PCR em tempo real para quantificar a expressão gênica das proteases e a correlação com as atividades enzimáticas. Será realizado ensaio imuno-histoquímico para as mesmas enzimas</p> <p>FUNDAMENTAÇÃO RACIONAL: Os neuropeptídeos tem papel fundamental na regulação, transmissão e execução das ações do sistema nervoso. Em muitos circuitos neurais, os neuropeptídeos têm ação fundamental e participam ativamente na regulação do ciclo sono-vigília. A metabolização de neuropeptídeos depende, geralmente, de atividades proteolíticas, seja pela liberação a partir de precursores proteicos inativos ou ativos, seja pela inativação de neuropeptídeos ativos pela ação proteolítica. Este estudo visa esclarecer o papel das enzimas proteolíticas nas alterações dos níveis de neuropeptídeos e seu possível envolvimento nas alterações neurofisiológicas observadas nos modelos de supressão de sono.</p> <p>MATERIAL E METODO: Estão descritos os procedimentos a serem realizados</p> <p>DETALHAMENTO FINANCEIRA: CNPq e AFIP - R\$ 480,00</p> <p>OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado</p> <p>PRIMEIRO RELATÓRIO PREVISTO PARA: 04/03/2010, os demais relatórios deverão ser entregues ao CEP anualmente até o término do estudo</p>		
O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.		
<ol style="list-style-type: none"> 1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto. 2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo. 3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes. 		
Rua Botucatu, 572 - 1º andar - conj 14. CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil Tel.: (011) 5571-1082 - 5539 - 7162

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO/HOSPITAL SÃO PAULO

Data: 11-09-2012 08:10:33

Página 2/2

Id = 1153

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Anexo 2. Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais da UNIFESP

UNIFESP
Universidade Federal de São Paulo

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

São Paulo, 28 de maio de 2014
CEUA N 7859280114

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Gabriela Polster
Depto/Disc: Psicobiologia
Prof Dr. Jair Ribeiro Chagas (orientador)

Título do projeto: "Determinação da concentração relativa de peptídeos intracelulares ligantes de receptores canabinóides em regiões específicas do cérebro de camundongos".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HS

Neuropeptídeos tem um papel fundamental no funcionamento de todo o organismo e, em particular, no sistema nervoso central. A atividade de inúmeros neuropeptídeos, principalmente a interação com os respectivos receptores, tem sido amplamente estudada. Entretanto os mecanismos de geração de neuropeptídeos ativos, a partir de precursores inativos ou ativos e os mecanismos de degradação desses compostos, tem sido menos detalhados na literatura. Nosso interesse voltou-se então para estudar peptídeos intracelulares gerados pela proteólise extralissossomal (e.g. proteasoma e oligopeptidases) que podem exercer um papel fisiológico importante modulando a transdução de sinal de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) ou tirosina quinases. Atualmente, centenas de peptídeos intracelulares foram identificados em linhagens celulares humanas e em cérebros de camundongos, mas a função fisiológica desses peptídeos permanece completamente desconhecida. Exemplos recentes, como a Hemopressina, Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Leu-Leu-Ger-His, e a RVD- e VD-Hemopressina, parecem ser neuropeptídeos endógenos ligantes de receptores canabinóides CB1, porém com ações contrárias. Se os peptídeos intracelulares endógenos desempenham papéis funcionais, como parece ser o caso baseado em estudos anteriores, seus níveis devem ser regulados sob várias condições fisiológicas e patológicas. Portanto nesse projeto nosso objetivo é desenvolver um método que consiga quantificar a concentração absoluta desses peptídeos em diferentes regiões do cérebro de camundongos, permitindo que posteriormente possamos avaliar alterações fisiológicas e patológicas dos peptídeos intracelulares no sistema nervoso central em modelos já estabelecidos. Em nosso caso, resultados prévios do grupo demonstraram modificações na expressão e atividade de metaloproteases na privação de sono paradoxal, onde o receptor canabinóide CB1 parece ter um papel importante. A título de aplicação da metodologia procuraremos quantificar os neuropeptídeos da família da hemopressina nesse modelo.

ANIMAIS:
Sexo utilizados:
- 60 Camundongos heterogênicos c57/bl6, Machos, idade: 3 meses
Procedência: cedeme
Manutenção: biotério do departamento de Psicobiologia

VIGÊNCIA DO ESTUDO:
Início previsto para: 06/2014 com término previsto para: 01/2016

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 24/04/2014, ANALISOU e APROVOU todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Relatórios parciais de andamento deverão ser enviados anualmente à CEUA até a conclusão do protocolo.

Rua Botucatu, 572, 1º andar conjunto 14 CEP 04023-061 São Paulo - tel: 55 (11) 5571-1062 / fax: 55 (11) 5539-7162
Horário de atendimento: das 9:00 às 13:00hs - e-mail: cepunifesp@unifesp.br
CEUA N 7859280114

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Anexo 3. Ofício CEUA/FCF 70, 2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 70.2014

CIÊNCIA

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em 04/07/2014, tomou ciência do projeto de pesquisa **Análise da via das quinureninas em modelos experimentais de restrição de sono e obesidade**, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas, que não envolverá atividade prática e/ou experimental no âmbito da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e que conta com prévia aprovação do(a) Comitê de Ética em Pesquisa do(a) **Universidade Federal de São Paulo** (conforme registro nº 144/09).

Orientador(a): **Profa. Dra. Ana Campa**
Pesquisador(a): **Alexandre Fróes Marchi**

São Paulo, 10 de julho de 2014.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

Anexo 4. Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais da FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO <hr/> FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACEUTICAS Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
<u>Ofício CEUA/FCF/06/2011</u>	
<u>CERTIFICADO</u>	
<p>A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "A inflamação aguda na gênese da obesidade: modelo experimental com foco na amilóide sérica A (SAA) como marcador inflamatório e de hipertrofia do tecido adiposo". (Protocolo CEUA/FCF/297), de responsabilidade Profa. Dra. Ana Campa, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 7 de fevereiro de 2011.</p>	
<p>São Paulo, 7 de fevereiro de 2011.</p>	
<p> Prof. Dr. Marco Antonio Stephano Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/FCF/USP</p>	
<hr/> <small>Av. Prof. Linus Freire, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP Fone: (11) 3081-3022 / Fax: (11) 3081-3077 - e-mail: ceua@fcf.usp.br</small>	

Anexo 5. Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais da FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
	FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
<small>Ofício CEUA/FCF/128/2012</small>	
<u>CERTIFICADO</u>	
<p>A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "Investigação dos efeitos de TZDs quimicamente modificadas em modelo animal de síndrome metabólica" (Protocolo CEUA/FCF/377), de responsabilidade da pesquisadora Jacqueline Cavalcante Silva sob a orientação da Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 03 de dezembro de 2012.</p>	
<p>São Paulo, 04 de dezembro de 2012.</p>

<p>Prof. Dr. Jilson de Oliveira Martins Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/FCF/USP</p>	
<hr/> <small>Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP Fone: (11) 3091-3622 / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br</small>	

Anexo 6.

Resumo enviado para o Cancer and Metabolism 2013

Cidade: Amsterdã

País: Holanda

Dia: 24 e 25 de junho de 2013

IDO and TDO inhibitors induce serotonin pathway on glioma cell lines

Ariane Rivellis Julio^{*1}, Renan Orsati Clara¹, Janine Coimbra Baptista¹, Alexandre Froes Marchi¹, Ana Carolina Moreno¹, Ana Campa¹, Ernani Pinto¹

¹ University of São Paulo. Faculty of Pharmaceutics Sciences. Department of Clinical Analysis and Toxicology.

Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) and tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) catalyze the major catabolic route for tryptophan (TRP); the kynurenine (KYN) pathway. Expression of IDO has been correlated with a poor clinical prognosis. IDO inhibition, especially by 1-methyl-tryptophan (1-MT), has been studied in clinical trials for different types of cancer. Recently, TDO participation in tumor growth has been gained attention. In some tumor lines, TDO seems to be the main source of KYN. Degradation of TRP to KYN in gliomas catalyzed by TDO is prevented by the inhibitor 680C91. Given the increased interest in the study of tryptophan metabolism in cancer, the roles of IDO and TDO in this process, and the metabolic cross talking between KYN pathway with other tryptophan metabolic pathways have been investigated as new targets, therefore, we evaluate the effects of 1-MT and 680C91 on the serotonergic pathway in two glioma cell lines, A172 and T98G. Supernatants from 24h - cell culture were extracted with acetonitrile or ethyl acetate. TRP metabolites were detected by ESI-LC-MS/MS in positive ion multiple reaction monitoring (MRM), transitions 233 (M + H) > m/z 174 to melatonin (MELATONINA), 177.2 (M + H) > m/z 160 to serotonin (5-HT) and 192.2 (M + H) > m/z 146 to 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA). The basal production of KYN is two fold higher in A172 than T98G, and the inhibitory effect of 1-MT and 680C91 were clearly significantly for A172. The TDO inhibitor was more effective than the IDO inhibitor indicating that TDO is the mainly responsible for KYN synthesis. The inhibitors caused an increasing in 5-HT of approximately 20%. 5-Hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) and melatonin (MELATONINA) were only detected when cells were treated with 1-MT. Our study showed that the TDO and IDO inhibitors, 1-MT and 680C91, respectively, had an impact on the serotonergic pathway of glioma cell lines and that this effect is broader for 1-MT. This finding may indicated that therapeutic strategies addressing IDO and TDO inhibition would affect concurrent metabolic routes, generating compounds that are known to affect tumor growth. TRP metabolic deviation, especially during IDO inhibition, might be one of the mechanism involved in benefit use of 1-MT.

Supported by: FAPESP, CNPq, CAPES

Anexo 7.

Resumo enviado para 110 World Congress on Inflammation 2013

Cidade: Natal

País: Brasil

Dia: 21 a 25 de setembro de 2013.

Expected and Previous unrepoPRed effects of IFN- γ on normal and tumor cells

Renata Chaves Albuquerque¹; Ana Carolina Ramos Moreno¹; Ariane Rivellis Julio¹; Renan Orsati Clara¹; Janine Coimbra Baptista¹; Alexandre Froes Marchi¹; Ernani Pinto¹; Sylvia Stuchi Maria Engler¹ e Ana Campa¹.

1 University of São Paulo. Faculty of Pharmaceutics Sciences. Department of Clinical Analysis and Toxicology.

Introduction: Most of the effects of IFN- γ on cells are well known such as metabolic alterations, cell cycle arrest and apoptosis, pattern of antigens expression and inhibition of angiogenesis. Among the metabolic alterations, the induction of indoleamine-2, 3 dioxygenase -1 (IDO-1) expression is notable. In this study, we identified the effect of IFN-g on the production of cytokines, HLA-DR and HLA-ABC antigen expression, cell viability and clonogenicity on melanoma and glioma lines. Furthermore, we have done analysis on the effect of IFN-g on metabolic pathways able to metabolize and synthesize indole compounds. These pathways included the enzymes IDO-2, TDO, TPH-1, AANAT, HIOMT, DDC and INMT in human normal cells (fibroblast, keratinocytes and melanocytes) and tumor cells (melanomas and gliomas).

Methods and Results: The cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-6, IL-8 and IL-10 were measured in 24h supernatants of cells. IFN-g only affected the production of IL-6 and IL-8 in some tumor cells. Expressions of membrane antigen were also induced. Although IFN-g did not affected cell viability and cell cycle in 24h, it caused a complete loss in clonogenicity. Although the effect of IFN-g on IDO-1 was massive, smaller modifications can also be observed on IDO-2 and TDO mRNA expression. For instance, using a specific inhibitor, it was possible to observe that TDO contributed to almost 50% of the pool of kynurenine produced in some of cells studied. Fluctuations in the expression of TPH-1, AANAT, HIOMT, DDC and INMT were also observed.

Conclusion: We described the effects of IFN-g on the expression of enzymes involved in the metabolism and synthesis of biological active indole compounds that may be related to some of its local and systemic effects.

Financial support: FAPESP, CAPES and CNPq

Anexo 8.

Resumo enviado para Congresso Brasileiro de Ciências Farmacêuticas.

Cidade: Búzios

País: Brasil

Dia: 24 a 27 de setembro de 2014.

LIVER TRYPTOPHAN DEGRADATION IS INCREASED IN MICE SUBMITTED TO SLEEP RESTRICTION

Marchi A.F¹, de Oliveira EM¹, Clara RO¹, Migliorini S¹, Visniauskas B², Tufik S², Chagas JR², Campa A¹.

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 580 Lineu Prestes Av, São Paulo, SP, BR05509000 Brazil.

²DepaPRamento de Psicobiologia, Universidade Federal de São Paulo. 925 Napoleão de Barros St. São Paulo, SP BR04024002 Brazil.

Introduction: Kynurenine pathway represents the major tryptophan (Trp) catabolic pathway and is essential for many physiological process. In liver, Trp is mainly degraded by tryptophan 2,3 dioxygenase (TDO) resulting in Kynurenine (kyn) that is further metabolized for NAD synthesis(Oxenkrug, 2010b). Sleep restriction generates many metabolic and physiological alterations, such as decreased immune cells activation(Moldofsky, 1995). Increased Trp degradation to Kyn is also linked to immune suppression ³. Although hepatic metabolism alterations reported in sleep restriction (SR) models, the Trp metabolism was not previously evaluated. **Materials and Methods:** Mice C57BL/6J were subjected to a multiple platform method of SR for 21 h daily, for 15 days. After this period, one group of animals was let in standard conditions for recovery period (RP) when the animals were euthanized. This experimental protocol was approved by the Ethical Committee of UNIFESP (approval n°0474/09). Trp and Kyn were extracted from liver tissue and its quantification was performed by HPLC with UV/Vis detection. **Results and Discussion:** Hepatic Kyn concentration increased two fold in sleep-restricted animals and the same profile was observed in the Kyn/Trp ratio, indicating a possible Kynurenine pathway activation through TDO induction. The increment of KYN is able to promote T cell suppression and increased immune tolerance(Prendergast, Metz e Muller, 2010). After the recovery period, Kyn levels restored to the basal concentration. The same effect was observed with the immune system activation in animals sleep-restricted after the recovery period, what support the hypothesis that Kyn mediate the immune suppression during SR. **Conclusion:** Increased Kyn production might be one of the mechanisms which immune cell activation is decreased in sleep-restricted animals.

Financial support: AFIP, CNPq, CAPES e FAPESP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

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

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

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

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

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

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

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

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

São Paulo, 23 de maio de 2014.

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