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

Triptamina e dimetiltryptamina em melanomas: biossíntese, metabolização e atividades antitumorais.

JANINE BAPTISTA COIMBRA

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE.

Orientador:
Prof Tit. Ana Campa

São Paulo

2012

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

Triptamina e dimetiltryptamina em melanomas: biossíntese, metabolização e atividades antitumorais.

JANINE BAPTISTA COIMBRA

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE.

Orientador:
Prof Tit. Ana Campa

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica

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

Coimbra, Janine Baptista

C679t Triptamina e dimetiltryptamina em melanomas : biossíntese,
metabolização e atividades antitumorais / Janine Baptista
Coimbra. -- São Paulo, 2012.
93p.

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

Orientador: Campa, Ana

1. Bioquímica : Toxicologia I. T. II. Campa, Ana, orientador.

615.9 CDD

JANINE BAPTISTA COIMBRA

Triptamina e dimetiltryptamina em melanomas: biossíntese, metabolização e atividades antitumorais.

Comissão julgadora da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof.Tit.Ana Campa
Orientador/Presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, ____ julho de 2012.

A Deus por me amparar nos momentos difíceis,
me dar força para superar as dificuldades,
mostrar os caminho nas horas incertas e me
suprir em todas as minhas necessidades.

*Aos meus amigos e família, por toda
compreensão, carinho, presença e apoio ao longo
do período de elaboração deste trabalho.*

*A minha orientadora Ana Campa, por toda
dedicação, ensinamentos, conselhos e incentivo.*

Aos meus amigos Carol, Renan e demais componentes do grupo W:

Meus amigos são assim...

“Meus amigos são todos assim: metade loucura, outra metade santidade.

Escolho-os não pela pele, mas pela pupila, que tem que ter brilho questionador e tonalidade inquietante.

Escolho meus amigos pela cara lavada e pela alma exposta.

Não quero só o ombro ou o colo, quero também sua maior alegria.

Amigo que não ri junto, não sabe sofrer junto.

Meus amigos são todos assim: metade bobeira, metade seriedade.

Não quero risos previsíveis, nem choros piedosos.

Quero amigos sérios, daqueles que fazem da realidade sua fonte de aprendizagem, mas lutam para que a fantasia não desapareça.

Não quero amigos adultos, nem chatos.

Quero-os metade infância e outra metade velhice.

Crianças, para que não esqueçam o valor do vento no rosto, e velhos, para que nunca tenham pressa.

Tenho amigos para saber quem eu sou, pois vendo-os loucos e santos, bobos e sérios, crianças e velhos, nunca me esquecerei de que a normalidade é uma ilusão imbecil e estéril.”

(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

- Aos meus maiores exemplos de vida, meus pais Jane e Roner, pelo incentivo aos estudos em todos os momentos de minha vida;
- A minha irmã Juliana, tias Cláudia e Eliane, vovó Áurea e vovô Dorico, vovó Izaura (*in memorian*) e demais familiares por todo apoio recebido;
- A todos os meus amigos de Vitória, principalmente Bianca e Jardel, pelo incentivo;
- A minha orientadora Ana Campa por me acolher tão bem em seu laboratório;
- Aos meus amigos do grupo W: Carol, Renan, Renata, Ariane e Alexandre, pelos ensinamentos e risadas (muitas) ao longo da elaboração deste trabalho;
- Aos demais colegas de laboratório Fran, Luzi, Edson, Sika, Pri e Silvana por todo o aprendizado;
- Ao professor Ernani e ao Felipe “Massas” pelo apoio técnico e científico;
- Ao professor Jair e colegas da UNIFESP também pelo apoio técnico e científico;
- Aos colegas Hadassa e Renato e todos do B17;
- Ao Thiago pelo apoio nas horas difíceis e pelo incentivo;
- As meninas da “casa das sete mulheres” e agregadas Alessandra, Eliana, Dani, Indrani e Georgia pelo apoio e risadas e por tornarem a minha estadia em SP mais feliz;
- A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho

MUITO OBRIGADA!!!

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena

Acreditar no sonho que se tem

Ou que seus planos nunca vão dar certo

Ou que você nunca vai ser alguém

Tem gente que machuca os outros

Tem gente que não sabe amar

Mas eu sei que um dia a gente aprende

Se você quiser alguém em quem confiar

Confie em si mesmo

Quem acredita sempre alcança!”

(Renato Russo)

Resumo

COIMBRA, J.B. **Triptamina e dimetiltriptamina em melanomas: biossíntese, metabolização e atividades antitumorais.** 2012. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O metabolismo do triptofano (TRP) se dá por três vias metabólicas: a via das quinureninas, a via serotoninérgica e a via das triptaminas. A primeira gera quinurenina e uma gama de produtos secundários e contribui para os fenômenos de tolerância e imunoescape de células tumorais. A via serotoninérgica leva à produção de neuromediadores e pode gerar melatonina. Há evidências de que compostos desta via podem controlar o crescimento tumoral. A via das triptaminas origina triptamina (TRY) e N-N-dimetiltriptamina (DMT) e representa a rota menos conhecida de degradação do TRP. Assim, investigamos a via das triptaminas em linhagens de melanoma humano SK-Mel-19 e SK-Mel-147. A expressão gênica das enzimas aminoácido aromático descarboxilase (DDC) e indoletilamina-N-metiltransferase (INMT), que convertem o TRP em TRY e DMT, respectivamente, foi determinada por PCR em tempo real. Os metabólitos desta via foram detectados por LC/MS no sobrenadante das culturas celulares. O teste da ferida (*scratch test*) e o ensaio clonogênico foram usados a fim de triar uma possível atividade antitumoral de TRY e DMT. Apesar de termos observado a expressão das enzimas DDC e INMT apenas na linhagem SK-Mel-147, ambas produziram triptaminas e metabolizaram TRY e DMT. Dependendo da linhagem houve a produção de ácido indolacético, DMT hidroxilado e produtos de abertura do anel indólico. Por fim, TRY e DMT diminuíram a migração e a proliferação das células tumorais. Há ainda muito a se estudar sobre a participação da TRY e DMT na biologia do tumor e as nossas descobertas ampliam o papel do metabolismo do triptofano no processo tumoral.

Palavras-chave: triptofano; triptaminas; ácido indolacético; dimetilriptamina hidroxilada ; N-N-dimetilformilquinuramina; tumor.

Abstract

COIMBRA, J.B. 2012. **Tryptamine and dimethyltryptamine on melanomas: biosynthesis, metabolism and antitumor activity**. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Tryptophan (TRP) metabolism occurs by three pathways: kynurenine, serotonergic and tryptamines paths. The first generates kynurenine and a range of secondary products and contributes to tolerance and tumor immune escape. Serotonergic pathway leads to the production of neuromediators and can generate melatonin. There are evidences that compounds of this pathway may control tumor growth. Tryptamines pathway originates tryptamine (TRY) and N, N-dimethyltryptamine (DMT) and represents the less-known route of TRP degradation. Thus, we investigated tryptamines pathway on human melanoma cell lines SK-Mel-19 and SK-Mel-147. Gene expression of the enzymes aromatic amino acid decarboxylase (DDC) and indoletilamina-N-methyltransferase (INMT), which convert TRP to TRY and DMT, respectively, was determined by real time PCR. The metabolites of this pathway were detected by LC/MS in cell culture supernatant. The scratch test and clonogenic assay were used to screen a potential antitumor activity for TRY and DMT. Although we have observed the expression of the enzymes DDC and INMT only on SK-MEL-147, both cells produced tryptamines and metabolized TRY and DMT. Depending on the cell line, products were indoleacetic acid (IAA), hydroxylated-DMT (OH-DMT) and indole opening ring products. Finally, TRY and DMT decreased tumor cells migration and proliferation. There is much to be studied about the participation of TRY and DMT in tumor biology, and our findings extend the role of tryptophan metabolism in tumoral process.

Keywords: tryptophan, tryptamine, indoleacetic acid, hydroxylated dimethyltryptamine, N, N-dimethylformilquinuramine; tumor.

Lista de abreviaturas

1-MT - 1-metiltriptofano

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

AHR - receptor de aril hidrocarbonetos

AIA- ácido 3-indolacético

AMK -N1-acetil-N2-5-metóxiquinuramina

DDC- aminoácido aromático descarboxilase

DMEM - Dulbecco's modified Eagle's médium

DMFK - N-N-dimetilformilquinuramina

DMK - N-N-dimetilquinuramina

DMSO - dimetilsulfóxido

DMT -N-N-dimetiltriptamina

DMT-NO- DMT-N-óxido

EtOAc -acetato de etila

H₂O - água

HClO - ácido hipocloroso

HIOMT- hidroxí-indol-O-metiltransferase

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

IDO - indolamina 2,3 dioxigenase

INMT- indoletilamina-N-metiltransferase

LC/MS - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas

LSD- diethylamina do ácido lisérgico

MAO-A- monoaminoxidase-A

MeOH - metanol

MLT- melatonina

MPO - mieloperoxidase

MTT- (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)

NAT -N-acetiltransferase

NMT -N-metiltriptamina

QUIN - quinurenina

TA - aminas traço

TDO - triptofano 2,3 dioxigenase

TRP - triptofano

TRY- triptamina

Lista de figuras

Figura 1: Rotas bioquímicas de degradação do triptofano. A figura ilustra a via das quinureninas, a via serotoninérgica e a via das triptaminas e as principais enzimas e metabólitos envolvidos nestas três rotas de degradação.	21
Figura 2: Metabolização do triptofano e formação de produtos de abertura do anel indólico.	24
Figura 3: Estrutura química da DMT e seus produtos de metabolização.....	25
Figura 4: Estrutura tridimensional da MPO.	25
Figura 5: Modelo cinético proposto para MPO.....	27
Figura 6: Possíveis vias de degradação da molécula de DMT por peroxidases como MPO, (A) envolvendo os compostos I e II, e (B) o composto III.	28
Figura 7: Inibição de IDO por TRY e DMT. Os gráficos grandes representam o <i>plot</i> duplo recíproco Lineweaver-Burk de formação de QUIN em função da concentração de L-triptofano na presença de (A) TRY e (B) DMT..	32
Figura 8: Efeitos da TRY e DMT em co-cultura. Análise morfológica das células A172 sem adição de estímulo (A), com 100 μ M de TRY (B) ou adição de DMT (C), na presença somente de células mononucleares (D), células mononucleares e 100 μ M de TRY (E) e células mononucleares com 100 μ M de DMT (F). Em (G), é mostrado a contagem das células A172 sob as mesmas condições previamente mencionadas.	32
Figura 9: Cromatograma do produto obtido com a síntese da DMT, usando como fase móvel EtOAc:MeOH (70:30) + 0,1% trietilamina	48
Figura 10: Espectro de massas do DMT após a purificação, análise em LC/MS do tipo <i>ion trap</i> por uma fonte de ionização por <i>electrospray</i> ,.....	49
Figura 11: Viabilidade das linhagens A172; T98G; Neuro-2A; SK-Mel-19 e SK-Mel-147 e de cultura primária de monócitos após 24h de exposição a 10; 50 e 100 μ M de TRY ou DMT. (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$	51
Figura 12: Expressão realtiva do gene <i>ddc</i> da via de produção do DMT por PCR em tempo real em cultura primária de fibroblasto, queratinócito e melanócitos humanos e em linhagens de melanomas humanos SK-Mel-19 e SK-Mel-147, bem como em linhagens de gliomas humanos A172 e T98G. A análise comparativa foi feita em relação a expressão do gene <i>ido1</i> da linhagem A172. O gene <i>gapdh</i> foi utilizado como calibrador da reação e o método comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foi utilizado para comparar os níveis de expressão de RNAm.	52

Figura 13: Expressão realtiva do gene *inmt* da via de produção do DMT por PCR em tempo real em cultura primária de fibroblasto, queratinócito e melanócitos humanos e em linhagens de melanomas humanos SK-Mel-19 e SK-Mel-147, bem como em linhagens de gliomas humanos A172 e T98G. A análise comparativa foi feita em relação a expressão do gene *ido1* da linhagem A172. O gene *gapdh* foi utilizado como calibrador da reação e o método comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foi utilizado para comparar os níveis de expressão de RNAm.53

Figura 14: Biossíntese de TRY e DMT em melanomas. A figura ilustra produção de TRY e DMT em células de melanoma humano SK-Mel-19 e SK-Mel-147. As células foram semeadas em placas de 6 poços e 24h após o período de adesão, TRY e DMT foram extraídos do sobrenadante das culturas utilizando-se diclorometano. A biossíntese dos compostos foi caracterizada por LC/MS do tipo triplo quadrupolo. Em todas as análises o indol foi utilizado como padrão interno. (*) $P < 0,05$54

Figura 15: Metabolização da DMT. A figura ilustra a formação dos produtos de metabolização da DMT, DMT-OH; DMFK e DMK bem como os metabólitos de melatonina AFMK e AMK por linhagens de melanoma humano SK-Mel-19 e SK-Mel-147 nas mesmas condições mencionadas na figura 14. (***) $P < 0.001$56

Figura 16: Metabolização da DMT. A figura ilustra a formação dos metabólitos TRY, DMT e AIA na ausência de tratamento, na presença de 100 μ M de TRY ou DMT e na presença de 1 mM de MLT durante 24h. Os metabolitos foram extraídos do sobrenadante das linhagens de melanoma SK-Mel-19 e SK-Mel-147 e analisados por LC/MS do tipo triplo quadrupolo. O indol foi utilizado como padrão interno durante as análises. (#) $P < 0.05$; (##) $P < 0.01$; (###) $P < 0.001$ -comparação em relação ao controle; (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$; (***) $P < 0.001$ -comparação entre as células SK-Mel-19 e SK-Mel-147.57

Figura 17: Metabolização da DMT. A figura ilustra a formação dos metabólitos de DMT, DMT-OH; DMFK e DMK e dos metabólitos da melatonina AFMK e AMK nas mesmas condições da figura 16.59

Figura 18: Expressão realtiva do gene *mpo* pelas linhagens SK-Mel-19 e SK-Mel-147 na ausência de estímulo e na presença de 100 μ M de TRY ou DMT por PCR em tempo real. A análise comparativa foi feita em relação a expressão do gene *ido1* da linhagem SK-Mel-147. O gene *gapdh* foi utilizado como calibrador da reação.61

Figura 19: Atividade peroxidásica dos melanomas SK-Mel-19 e SK-Mel-147. 1×10^6 células foram incubadas com 0,5 mM de H_2O_2 e 1 mM de luminol. O meio de reação utilizado foi PBS glicosilado, pH 7,4 e temperatura 37°C. (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$ em relação ao controle de células.61

Figura 20: Expressão gênica das enzimas IDO1, TPH, NAT, HIOMT, DDC e INMT das rotas de degradação do TRP na ausência de estímulo e na presença de 100 μ M de TRY ou DMT por PCR em tempo real. O gene *gapdh* foi utilizado como calibrador da reação. A análise comparativa foi feita em relação a expressão do gene *ido1* na linhagem SK-Mel-147. O método comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foi utilizado para comparar os níveis de expressão de RNAm. (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$; (***) $P < 0.001$64

Figura 21: Produção de quinurenina (μ M) pelas células SK-Mel-19 e SK-Mel-147 tratadas com 100 μ M de TRY ou DMT por um período de 24h. (**) $P < 0.01$; (***) $P < 0.001$65

Figura 22: Imagens de microscopia óptica de migração celular de gliomas humanos A172 em 24 e 36h e painéis mostrando a quantificação da percentagem de migração das células após tratamento com 100 μ M de TRY ou DMT. Células cultivadas apenas com meio foram apresentados como controle de referência.67

Figura 23: Imagens de microscopia óptica de migração celular de gliomas humanos T98G em 24 e 36h e painéis mostrando a quantificação da percentagem de migração das células após tratamento com 100 μ M de TRY ou DMT. Células cultivadas apenas com meio foram apresentados como controle de referência.68

Figura 24: Imagens de microscopia óptica de migração celular de melanomas humanos SK-Mel-19 em 24 e 36h e painéis mostrando a quantificação da percentagem de migração das células após tratamento com 100 μ M de TRY ou DMT. Células cultivadas apenas com meio foram apresentados como controle de referência.69

Figura 25: Imagens de microscopia óptica de migração celular de melanomas humanos SK-Mel-147 em 24 e 36h e painéis mostrando a quantificação da percentagem de migração das células após tratamento com 100 μ M de TRY ou DMT. Células cultivadas apenas com meio foram apresentados como controle de referência. (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$70

Figura 26: Ensaio clonogênico. Imagem da formação de colônias em células de melanoma humano SK-MEL-19 e SK-MEL-147 tratados com 100 μ M de TRY ou DMT de 2 em 2 dias, durante 14 dias . As células do controle foram cultivadas apenas com meio culturas acrescido de 0,2% de DMSO.72

Sumário

1.INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	19
<i>1.1. O METABOLISMO DO TRIPTOFANO E A VIA DAS TRIPTAMINAS.....</i>	<i>20</i>
<i>1.2. BIODSÍNTESE DE TRY E DMT</i>	<i>21</i>
<i>1.3. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS.....</i>	<i>22</i>
<i>1.4. METABOLIZAÇÃO DA TRY E DMT.....</i>	<i>23</i>
<i>1.5. METABÓLITOS DO TRP E FUNÇÕES BIOLÓGICAS</i>	<i>28</i>
<i>1.6 O METABOLISMO DO TRIPTOFANO E A VIA DAS TRIPTAMINAS NO PROCESSO TUMORAL.....</i>	<i>30</i>
2. OBJETIVOS	34
<i>2.1. OBJETIVO GERAL</i>	<i>35</i>
<i>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	<i>35</i>
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
<i>3.1. SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DA DMT.....</i>	<i>37</i>
<i>3.2. CULTIVO CELULAR</i>	<i>38</i>
<i>3.3. ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO DE HUMANOS E OBTENÇÃO DE MONÓCITOS.....</i>	<i>38</i>
<i>3.4. ENSAIOS CELULARES E DMT.....</i>	<i>39</i>
<i>3.5. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE</i>	<i>39</i>
<i>3.6. EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS DAS VIAS DAS TRIPTAMINAS.....</i>	<i>40</i>
<i>3.7. BIODSÍNTESE DE TRY E DMT</i>	<i>40</i>
<i>3.8. METABOLIZAÇÃO DE TRY E DMT.....</i>	<i>41</i>
<i>3.9. INFLUÊNCIA DOS METABÓLITOS TRY, DMT E MLT NA METABOLIZAÇÃO DA DMT.....</i>	<i>42</i>
<i>3.10. EXPRESSÃO GÊNICA DE MIELOPEROXIDASE.....</i>	<i>42</i>
<i>3.11. ATIVIDADE PEROXIDÁSICA</i>	<i>43</i>
<i>3.12. EFEITO DE TRY E DMT SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS DA VIA DO TRP</i>	<i>43</i>
<i>3.13.PRODUÇÃO DE QUINURENINA EM LINHAGENS TRATADAS COM TRY E DMT ..</i>	<i>44</i>
<i>3.14. MIGRAÇÃO CELULAR</i>	<i>45</i>
<i>3.15. ENSAIO CLONOGÊNICO</i>	<i>45</i>
<i>3.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	<i>46</i>

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1. <i>SÍNTESE DA DMT</i>	48
4.2. <i>ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE DE TRY E DMT</i>	49
4.3. <i>EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS DA VIA DAS TRIPTAMINAS.....</i>	52
4.4. <i>BISSÍNTESE DE TRY E DMT POR LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS</i>	54
4.5. <i>METABOLIZAÇÃO DE TRY E DMT</i>	55
4.6. <i>INFLUÊNCIA DOS METABÓLIDOS TRY, DMT E MLT NA METABOLIZAÇÃO DA DMT.....</i>	57
4.7. <i>EXPRESSÃO GÊNICA DE MIELOPEROXIDASE E ATIVIDADE PEROXIDÁSICA</i>	60
4.8. <i>EFEITO DE TRY E DMT SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS DA VIA DO TRP</i>	62
4.9. <i>PRODUÇÃO DE QUINURENINA EM LINHAGENS TRATADAS COM TRY E DMT ...</i>	65
4.10. <i>ATIVIDADES ANTITUMORAIS.....</i>	66
5. CONCLUSÕES.....	74
6. REFERÊNCIAS	77
7. ANEXOS	84
7.1. <i>CURRÍCULO LATTES</i>	85
7.2. <i>FICHA DO ALUNO</i>	91

1.Introdução e justificativa

1.1. O METABOLISMO DO TRIPTOFANO E A VIA DAS TRIPTAMINAS

O triptofano (TRP) é um aminoácido essencial para os seres humanos e desempenha um amplo papel no equilíbrio fisiológico. É utilizado para a síntese proteica e pode ser convertido em compostos que possuem diferentes atividades biológicas. O TRP é metabolizado quase em sua totalidade pela via das quinureninas originando quinurenina (QUIN) através de uma reação catalisada pela enzima triptofano 2,3 dioxigenase (TDO), presente no fígado, e pela enzima indolamina 2,3 dioxigenase (IDO), presente em diversos tecidos (Brody, Costantino *et al.*, 2009).

Como uma via de degradação alternativa a via das quinureninas, o TRP pode ser convertido em serotonina. Alguns tecidos têm a capacidade de utilizar a serotonina para a síntese de melatonina (MLT), que é capaz de capturar radicais de oxigênio e gerar diferentes metabólitos, fruto do produto de abertura do anel indólico, sendo a N1-acetil-N2-formil-5-metóxiquinuramina (AFMK) o principal deles (Hirata, Hayaishi *et al.*, 1974; Silva, S. O., Ximenes, V. F. *et al.*, 2000; Tan, Manchester *et al.*, 2000; Tan, Hardeland *et al.*, 2003).

Apesar da via das quinureninas e serotoninérgica somadas serem responsáveis quase pela totalidade do metabolismo de TRP, uma pequena parte pode seguir a via das triptaminas, na qual o TRP é convertido em N-N-dimetiltriptamina (DMT). Os eventos biológicos associados a esta via metabólica ainda não estão claros e há um interesse crescente no assunto (Fontanilla, Johannessen *et al.*, 2009).

A via das triptaminas inclui a etapa de descarboxilação do triptofano pela enzima aminoácido aromático descarboxilase (AADC) originando triptamina (TRY); que, logo em seguida sofre ação da indoletilamina-N-metiltransferase (INMT) em que grupamentos metil da S-adenosilmetionina são transferidos para a TRY, gerando primeiramente N-metiltriptamina (NMT), e em seguida DMT (Jacob e Presti, 2005) (**Figura 1**).

Figura 1: Rotas bioquímicas de degradação do triptofano. A figura ilustra a via das quinureninas, a via serotonérgica e a via das triptaminas e as principais enzimas e metabólitos envolvidos nestas três rotas de degradação.

1.2. BIOCÍNTese DE TRY E DMT

Após a descoberta de que a enzima INMT está presente em pulmões de coelhos, estudos foram realizados na tentativa de detectar a presença TRY e DMT em humanos e outros mamíferos (Axelrod, 1961). Em 1965, TRY, DMT e 5-hidroxi-*N,N*-dimetiltriptamina (bufotenina) foram detectados em amostras de urina (TRY = 30 – 120 µg/24 horas; DMT = 42,98 ± 8,6 µg/24 horas), sangue (TRY = 0,005 – 0,02 µg/mL; DMT = 0,008-0,055 µg/mL) e fluido cerebrospinal de indivíduos saudáveis, sendo reportados como constituintes endógenos normais de seres humanos (Franzen e Gross, 1965). Porém, estudos subsequentes encontraram concentrações menos elevadas, cerca de 0,4 µg/24 horas de DMT na urina e 0,5

ng/mL no sangue (Lipinski, Mandel *et al.*, 1974; Oon, 1977). Ainda hoje não há estudos quantitativos conclusivos a respeito da concentração exata de DMT e TRY devido ao seu rápido metabolismo. Porém, sabe-se que estes compostos também estão presentes em fezes, rim e pulmão de humanos (Karkkainen, Forsstrom *et al.*, 2005; Burchett e Hicks, 2006). Nesse sentido, procuramos identificar a síntese de DMT e TRY em culturas celulares estabelecidas em nosso laboratório.

Além de produzida por células humanas, a DMT também é sintetizada pela planta *Psycotria viridis*, utilizada na preparação de um chá com propriedades alucinógenas denominado *ayahuasca*, possuindo uma importância toxicológica significativa (Costa, 2005; Jacob e Presti, 2005).

1.3. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

A DMT possui atividade alucinógena devido a interação com receptores 5-HT_{1a}, 5HT_{1b}, 5-HT_{2a} e 5HT_{2c} presentes no sistema nervoso central (Yritia, Riba *et al.*, 2002) porém, esta atividade alucinógena deixa de existir quando o composto é utilizado por via oral devido à degradação de primeira passagem realizada pela enzima monoaminoxidase-A (MAO-A) periférica (Ott, 1994). Entretanto, análises químicas demonstraram que os principais componentes do chá religioso (ayahuasca) são alcalóides com estrutura de β -carbolinas tais como harmina, harmalina e tetra-hidro-harmalina que são inibidoras da MAO e impedem a degradação da DMT no trato gastrointestinal, permitindo que a substância fique disponível para absorção e exerça a atividade alucinógena (Riba, Rodriguez-Fornells *et al.*, 2001; Riba, Valle *et al.*, 2003)

Em relação à toxicidade, a DL₅₀ da DMT para humanos é de 1,6 mg/kg quando administrada por via intravenosa e cerca de 8 mg/kg por via oral. Sendo assim, podemos

constatar que o composto apresenta pouca toxicidade se comparado a DL50 de alucinógenos clássicos como, por exemplo, a dieltilamina do ácido lisérgico (LSD), que possui uma DL50 de cerca de 0,2-1 mg/kg, por via oral (Hoffer, 1965; Gable, 2007).

A importância da presença em humanos de um composto reconhecidamente alucinógeno ainda é uma questão a ser respondida, estudos foram realizados, porém não se sabe ao certo nem como a DMT é metabolizada pelas células.

1.4. METABOLIZAÇÃO DA TRY E DMT

Sabe-se que TRY é convertida à metiltriptamina e DMT, mas pouco se sabe sobre a metabolização da DMT. De uma dose administrada por via intramuscular, apenas 0,07% são excretados na urina na forma inalterada e 25% são metabolizados a ácido 3-indolacético (AIA). Esse perfil de biotransformação sugere a existência de outros possíveis metabólitos ainda não identificados (Kaplan, Mandel *et al.*, 1974; Hryhorczuk, Rainey *et al.*, 1986).

Em 1956, foi proposto que as maiores rotas de metabolização da DMT *in vivo* eram a 6-hidroxilação, N-demetilação e a oxidação pela enzima MAO-A (Szara, 1956). Posteriormente, em 1986, um estudo em diversos tecidos de rato demonstrou que em tecido cerebral, a DMT é metabolizada a DMT-N-óxido (DMT-NO) e indolacetaldeído, este último foi encontrado em maiores concentrações e é rapidamente convertido a AIA. Em tecido renal, os autores demonstraram a presença de DMT-NO e uma quantidade pequena de NMT. Já no fígado, foram encontrados, DMT-NO, NMT e AIA (Sitaram, Talomsin *et al.*, 1987). Assim, percebemos que tecidos diferentes apresentam perfis distintos de metabolização da DMT de modo a favorecer o aparecimento de um ou outro metabólito.

Apesar de uma rota metabólica para a DMT ter sido sugerida, a rota metabólica concreta e o papel das enzimas da via e metabólitos formados continuam não esclarecidas.

Tendo em vista que compostos indólicos endógenos são oxidados por diferentes peroxidases, por uma via dependente de ânion superóxido originando produtos de abertura do anel indólico, denominados genericamente de quinureninas (Ximenes, Campa *et al.*, 2001; Ximenes, Silva *et al.*, 2005) (**Figura 2**), nosso grupo de pesquisa demonstrou que a DMT também pode ser degradada por peroxidases gerando um produto hidroxilado (DMT-OH) e os produtos de abertura do anel indólico, análogos da quinurenina, N-N-dimetilformilquinuramina (DMFK) e N-N-dimetilquinuramina (DMK) (**Figura 3**) (Gomes, 2008).

Figura 2: Metabolização do triptofano e formação de produtos de abertura do anel indólico.

Figura 3: Estrutura química da DMT e seus produtos de metabolização.

Um mecanismo para a formação dos produtos de abertura do anel indólico da DMT foi proposto por nosso grupo com base no modelo cinético de mieloperoxidases (MPO). Esta enzima é uma hemoproteína conhecida por sua poderosa atividade pró-oxidativa e pró-inflamatória, e está presente principalmente nos grânulos azurófilos de neutrófilos (Loria, Dato *et al.*, 2008). Apresenta quatro cadeias polipeptídicas (estrutura tetrâmérica) constituída de duas subunidades - alfa e beta e o grupo prostético heme, derivado da ferriprotoporfirina IX ligado covalentemente à sua porção protéica (**Figura 4**) (Furtmuller, Zederbauer *et al.*, 2006).

Figura 4: Estrutura tridimensional da MPO.

O mecanismo de reação da MPO envolve a utilização de H_2O_2 para catalisar a oxidação de uma série de compostos orgânicos. A princípio, MPO se encontra em sua forma

nativa ou férrica (Fe^{3+}) que, ao reagir com H_2O_2 , forma o intermediário redox denominado composto I, que nada mais é que a própria MPO na forma cataliticamente ativa. Por sua vez, o composto I é capaz de oxidar o ânion cloreto por uma transferência simples de dois elétrons gerando ácido hipocloroso (HClO) (Furtmuller, Zederbauer *et al.*, 2006; Hansson, Olsson *et al.*, 2006).

Com a formação do composto I, inicia-se um ciclo peroxidásico clássico (**Figura 5**) envolvendo composto I, composto II e a forma férrica da enzima. A oxidação de substratos orgânicos (RH) se dá por meio de duas transferências sucessivas de um elétron envolvendo os intermediários I e II. A produção de HClO ocorre por competição ao composto I, entretanto, sua produção pode ser inibida caso outra molécula de RH ou ânion superóxido estejam presentes no meio para reagir com o composto II e reciclar MPO à forma férrica, iniciando um novo ciclo (Haptom, 1998; Furtmuller, Zederbauer *et al.*, 2006).

Existe também a possibilidade da formação do composto III proveniente da MPO na forma férrica com excesso de ânion superóxido ou H_2O_2 . O composto III, que normalmente está em um estado de oxidação seis, é representado como um híbrido de ressonância entre um complexo da forma ferrosa com oxigênio ($\text{Fe}^{2+}.\text{O}_2$) e da forma férrica com ânion superóxido ($\text{Fe}^{3+}.\text{O}_2^-$) (Furtmuller, Zederbauer *et al.*, 2006).

Figura 5: Modelo cinético proposto para MPO.

A MPO catalisa a oxidação de diversos compostos indólicos biologicamente importantes como o triptofano e a melatonina (Silva, S. O., Ximenes, V. F. *et al.*, 2000; Jantschko, Furtmuller *et al.*, 2002). Quando a melatonina reage com o composto I, forma-se um radical que, na presença de oxigênio molecular ou ânion superóxido, dá origem a um intermediário dioxetânico que se cliva produzindo a abertura do anel indólico, originando o AFMK (Silva, S. O., Ximenes, V. F. *et al.*, 2000; Ximenes, Silva *et al.*, 2005).

Para a metabolização da DMT, nosso grupo de pesquisa sugeriu um mecanismo semelhante ao que ocorre com a melatonina. O composto reagiria com o composto I formando o radical $DMT^{\bullet}$ que, pela reação com oxigênio molecular ou ânion superóxido, formaria um intermediário do tipo dioxetânico, gerando o composto DMFK, após diferentes clivagens. Em seguida, o DMFK sofreria deformilação e daria origem ao DMK (**Figura 6A**). Existe ainda a

possibilidade da formação do produto hidroxilado, por meio de um ciclo envolvendo composto III (**Figura 6B**) (reação da forma nativa com ânion superóxido).

Figura 6: Possíveis vias de degradação da molécula de DMT por peroxidases como MPO, (A) envolvendo os compostos I e II, e (B) o composto III.

1.5. METABÓLITOS DO TRP E FUNÇÕES BIOLÓGICAS

Os metabólitos do TRP desempenham importantes atividades biológicas em processos fisiológicos como inflamação e resposta imune (Dai e Dai, 2008) e patológicos como depressão, doenças neurodegenerativas e câncer (Maes, Yirmiya *et al.*, 2009; Godin-Ethier, Hanafi *et al.*, 2011; Szalardy, Klivenyi *et al.*, 2012).

A via das quinureninas produz metabólitos que tem atividades reportadas em linfócitos, SNC e periférico (Stone e Darlington, 2002; Klivenyi, Toldi *et al.*, 2004). A QUIN é bastante conhecida por sua capacidade de suprimir a atividade de linfócitos T e células dendríticas (Belladonna, Grohmann *et al.*, 2006; Belladonna, Puccetti *et al.*, 2007). Alguns dos intermediários dessa via possuem ainda ações neuroprotetoras como, ácido quinurênico, e

neurotóxicas, como o composto 3-hidroxiquinurenina que pode ser convertido em quinoniminas e espécies reativas de oxigênio (ERO), agentes que iniciam apoptose celular (Eastman e Guilarte, 1990; Okuda, Nishiyama *et al.*, 1998; Schwarcz, Ceresoli-Borroni *et al.*, 1999).

Em relação à via serotoninérgica, nosso grupo de pesquisa demonstrou que AFMK, análogo de quinurenina produzido a partir da oxidação de melatonina, inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias por neutrófilos, e está presente em altas concentrações em líquido cefalorraquidiano de indivíduos com meningite viral (Silva, Carvalho *et al.*, 2006). Além disso, a MLT é capaz de agir no sistema nervoso central atuando na indução do sono; no sistema gastrointestinal, promovendo a motilidade intestinal e a regulação do transporte de íons; e no sistema imune, aumentando a produção de citocinas e a atividade de células NK (Carpentieri, De Barboza *et al.*, 2012).

Apesar das funções descritas para a via das quinureninas e via serotoninérgica, pouco se sabe sobre as atividades biológicas dos metabólitos envolvidos na via das triptaminas.

Logo após a descoberta da DMT endógena em humanos, alguns pesquisadores correlacionaram o composto com a presença de esquizofrenia, pois havia um aumento nas concentrações de DMT na urina destes pacientes, entretanto nem todos os pacientes esquizofrênicos excretavam altas concentrações do composto. Assim, concluiu-se que DMT não possuía função causal na esquizofrenia, mas poderia exacerbar certas características da psicose (Tanimukai, 1970; Jacob e Presti, 2005).

Uma nova interpretação para a presença de altas concentrações de DMT na urina de esquizofrênicos foi postulada após a descoberta da ligação do composto a receptores de aminas traço (TA). Estes receptores foram descobertos em 2001 em cérebro e sistema periférico de vertebrados. O termo “aminas traço” se refere a um grupo de aminas e seus isômeros, estruturalmente relacionados, estando inclusos TRY e DMT, e são denominados

desta forma pelo fato de estarem presentes em baixíssimas concentrações no tecido cerebral de mamíferos (Boulton, 1976; Boulton, 1982). Assim como os receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, os receptores TA também são acoplados à proteína G e estão envolvidos com centros emotivos do corpo, mostrando possíveis conexões com muitas condições psiquiátricas (Borowsky, 2001).

Com estes achados, foi sugerido então que o aumento da produção da DMT poderia ser uma resposta homeostática para suprimir a atividade psicótica nos pacientes com esquizofrenia. Consequentemente, DMT em baixas concentrações poderia agir como ansiolítico endógeno, enquanto que em altas, tais como as associadas à atividade alucinógena, seria capaz de produzir mudanças extremas na consciência (Jacob e Presti, 2005).

Além disso, a DMT foi descrita também como sendo uma ligante endógena do receptor Sigma-1. Um estudo recente demonstrou a presença da enzima INMT, responsável pela produção de DMT, em motoneurônios em locais próximos a este receptor, indicando que a DMT poderia ativar o receptor Sigma-1 e regular a excitabilidade dos motoneurônios, podendo estar envolvido com o sistema motor. De fato, a injeção de DMT foi capaz de aumentar a locomoção de camundongos WT (Fontanilla, Johannessen *et al.*, 2009; Mavlyutov, Epstein *et al.*, 2012).

1.6. O METABOLISMO DO TRIPTOFANO E A VIA DAS TRIPTAMINAS NO PROCESSO TUMORAL

A relação entre câncer e elevado catabolismo de TRP foi revelada inicialmente na década de 50, quando foram encontrados metabólitos do TRP na urina de pacientes com câncer de bexiga (Boyland, 1955). Atualmente, sabe-se que as três rotas de metabolização do

TRP produzem compostos biologicamente relevantes para o crescimento e progressão tumoral.

Existem diversas evidências que comprovam que a MLT esta envolvida na prevenção da iniciação, promoção e progressão tumoral. Estudos demonstram que a MLT inibe a proliferação, aumenta a expressão de genes proapoptóticos e reduz o potencial metastático em de células de câncer de mama (Carpentieri, De Barboza *et al.*, 2012). Um efeito semelhante foi encontrado também em células de carcinoma do cólon murino, sendo que a associação do composto ao tratamento quimioterápico neste tipo de tumor tem se mostrado benéfica para os pacientes (Farriol, Venereo *et al.*, 2000; Cerea, Vaghi *et al.*, 2003; Dziegiel, Podhorska-Okolow *et al.*, 2008). Neste contexto, MLT protege os órgãos como rim, coração e medula óssea dos efeitos da quimioterapia e radioterapia, permitindo o uso de concentrações mais elevadas destas drogas (Dziegiel, Podhorska-Okolow *et al.*, 2008).

Em relação à via das quinureninas, a expressão de IDO em tumores e consequente aumento de QUIN, tem sido relacionada ao um pobre prognostico em pacientes com câncer, pois a QUIN produzida age em células do sistema imune suprimindo a atividade de células T, o que favorece a proliferação tumoral (Munn e Mellor, 2007; Ino, Yamamoto *et al.*, 2008).

Na terapêutica, a inibição da IDO tem sido considerada uma estratégia excelente para a restauração da imunidade do hospedeiro e o uso do 1-metiltryptofano (1-MT) ou outros inibidores da IDO juntamente com o tratamento convencional tem sido considerado (Muller e Scherle, 2006). Recentemente nosso grupo identificou que TRY e DMT inibem a enzima IDO, efeito esse observado sobre a IDO recombinante humana (**Figura 7**) e em células tumorais de glioma humano A172. O mais importante foi que tanto TRY quanto DMT aumentaram o efeito citotóxico de linfócitos sobre a célula tumoral (**Figura 8**) (Tourino, 2012).

Figura 7: Inibição de IDO por TRY e DMT. Os gráficos grandes representam o *plot* duplo recíproco Lineweaver-Burk de formação de QUIN em função da concentração de L-triptofano na presença de (A) TRY e (B) DMT.

Figura 8: Efeitos da TRY e DMT em co-cultura. Análise morfológica das células A172 sem adição de estímulo (A), com 100 μM de TRY (B) ou adição de DMT (C), na presença somente de células mononucleares (D), células mononucleares e 100 μM de TRY (E) e células mononucleares com 100 μM de DMT (F). Em (G), é mostrado a contagem das células A172 sob as mesmas condições previamente mencionadas.

Neste cenário, além de os produtos das vias do triptofano possuírem atividades biológicas no desenvolvimento e no processo de imunoescape tumoral, também participam da regulação das mesmas, fato que motivou o grupo a pesquisar o metabolismo do TRP em

linhagens tumorais à procura de respostas sobre a interação entre as vias com a progressão celular.

Devido à importância dos metabólitos do TRP, tanto no processo fisiológico normal quanto no crescimento e progressão tumoral, um dos objetivos da presente pesquisa foi avaliar o perfil de metabolização de TRY e DMT em linhagens celulares estabelecidas em nosso laboratório. Além disso, sabendo que alguns metabólitos do TRP possuem atividades antitumorais reconhecidas, investigamos se TRY e DMT também apresentam essa atividade.

2. Objetivos

2.1. OBJETIVO GERAL

- Verificar a possibilidade de biossíntese e metabolização de TRY e DMT em linhagens de células tumorais.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a citotoxicidade de TRY e DMT em linhagens de células tumorais e em cultura primária de monócitos buscando compreender o grau de citotoxicidade destes compostos;
- Avaliar a expressão gênica das enzimas da via das triptaminas em células tumorais e normais, a fim de investigar se a expressão destas enzimas se correlaciona com o fenótipo tumoral;
- Avaliar e comparar a biossíntese de TRY e DMT em linhagens de melanoma humano SK-Mel-19 e SK-Mel-147;
- Avaliar a possibilidade de formação de produtos de abertura do anel indólico originados da metabolização da DMT em linhagens de células tumorais;
- Determinar o impacto de TRY (molécula precursora da síntese de DMT), da própria DMT e de melatonina (molécula antioxidante) no perfil de metabolização da DMT para estabelecer um possível mecanismo de regulação desta via;
- Avaliar os efeitos de TRY e DMT sobre a expressão gênica de enzimas das outras vias de metabolização do triptofano;
- Verificar se há mudança no padrão de formação de quinurenina quando as células são tratadas com TRY ou DMT;
- Verificar o efeito direto de TRY e DMT sobre a migração e proliferação tumoral em linhagens de melanomas humanos.

3. Materiais e Métodos

3.1. SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DA DMT

A síntese da DMT foi realizada no Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo (FCF-USP), a partir de triptamina comercial. Uma solução de formaldeído (7,5 mL) em metanol (MeOH) (7,5 mL) e uma solução de boroidreto de sódio (0,9 g) em água (H₂O) (15 mL) foram adicionadas gota a gota, simultaneamente, em uma solução de triptamina (0,8004g) em MeOH (35 mL) resfriado a 0°C, com banho de gelo e agitação constante. A solução foi agitada a 0°C por 0,5 h. Em seguida, adicionou-se ácido clorídrico 4N cautelosamente até chegar em valor de pH 3, e a mistura resultante foi agitada por 10 minutos. O pH foi ajustado para 6,5- 7 com bicarbonato de sódio, o MeOH foi evaporado e acrescentou-se H₂O (50 mL). Lavou-se a mistura com acetato de etila (EtOAc) (3X 50 mL). Para retirar a água do sistema adicionou-se sulfato de magnésio. A mistura foi filtrada e novamente lavada com EtOAc. A fase orgânica foi seca e obteve-se um sólido marrom.

A purificação se deu por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em coluna preparativa Luna C18 (250 x 10 mm, 5µm, ®Phenomenex), usando como fase móvel EtOAc:MeOH (70:30) + 0,1% trietilamina, em método isocrático. O material foi coletado por coletor automático e posteriormente seco em bomba de vácuo. Os produtos de síntese, depois de purificados foram analisados em LC/MS do tipo *ion trap* por uma fonte de ionização por *electrospray*, operada no modo positivo (ESI+).

Devido à ausência de dados com relação à absortividade (ϵ) da DMT, a quantificação teve que ser feita diante da pesagem do precipitado formado após a secagem do solvente em que estava dissolvido. Um *ependorff* estéril foi inicialmente pesado e, após a secagem do material em SpeedVac®, pesado novamente, sendo a diferença de peso correspondente à massa de DMT em solução. De posse desse valor, foram feitas soluções de 50 mM em metanol que permaneceram estocadas sob refrigeração (8 graus) e protegidas da luz.

3.2. CULTIVO CELULAR

As linhagens celulares de glioma humano A172 e T98G, de melanoma humano SK-Mel-19 e SK-Mel-147 e a linhagem de neuroblastoma de camundongo Neuro-2A foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) alta glicose (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Sigma), 50 U/ ml de penicilina e 50 mg/mL de estreptomicina (Invitrogen). Para cultura primária de monócitos foi utilizado o meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e as culturas primárias de melanócito, queratinócito e fibroblasto foram cultivadas em meio 245 CF (Cascade Biologics), Epilife® Medium (Invitrogen) e DMEM (Invitrogen), respectivamente. Todas as células foram incubadas em estufa a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂.

3.3. ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO DE HUMANOS E OBTENÇÃO DE MONÓCITOS

Células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) foram obtidas a partir do sangue venoso, coletado diretamente em tubos contendo heparina sódica. Um gradiente de histopaque® 1077 (Sigma) foi utilizado para separar os componentes celulares do sangue, segundo as instruções do fabricante. Os monócitos foram separados dos linfócitos por adesão celular.

3.4. ENSAIOS CELULARES E DMT

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

3.5. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Este ensaio foi realizado através do teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) que é amplamente utilizado para determinação da viabilidade de células isoladas. O teste MTT baseia-se na redução do sal tetrazolato pela enzima hidrogenase succínica presente na mitocôndria, a qual adquire uma coloração violácea avaliada por espectrofotometria.

Para realização deste ensaio, as células das linhagens tumorais foram cultivadas em placas de 96 poços numa densidade de 1×10^4 células/mL e os monócitos em densidade de 5×10^3 células/poço, num volume final de 200 μ L. Após um período de adesão de 24h, acrescentaram-se concentrações de 10, 50 e 100 μ M de TRY ou DMT que permaneceram por 24h em contato com as culturas. Passado este período, foi acrescentado em cada poço 40 μ L de uma solução de MTT 5 mg/mL. Após um período de 4h, o MTT foi retirado e adicionou-se 100 μ L de DMSO em cada poço até a dissolução dos cristais violáceos produzidos. As absorbâncias de cada poço foram lidas em espectrofotômetro de placas (Biotek®) em comprimento de onda de 550 nm.

3.6. EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS DAS VIAS DAS TRIPTAMINAS

A extração do RNA total das células foi realizado pelo Kit Rneasy (Qiagen), de acordo com protocolo recomendado pelo fornecedor. O RNA extraído foi quantificado por NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) a 260 nm e sua pureza avaliada pela relação entre comprimentos de onda de 260/280 nm. A síntese da fita de DNA complementar foi realizada pelo kit *SuperScriptTM First-Strand synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. As células foram avaliadas quanto a expressão de *ddc* e *inmt* por PCR em tempo real pelo sistema TaqMan. Os iniciadores e sondas utilizados foram inventariados pela empresa Invitrogen. A expressão relativa dos genes foi calculada pelo método matemático de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

3.7. BIOSSÍNTESE DE TRY E DMT

A biossíntese de TRY e DMT foi avaliada nas linhagens de melanoma humano SK-Mel-19 e SK-Mel-147. As células foram cultivadas em placas de seis poços por 24 h. Para a extração de TRY e DMT, o meio de cultura foi separado e colocado em um tubo Falcon 15 mL contendo 20 µL de NaOH 0,1 M e agitado em vórtex. Neste momento, foi adicionado 100 µL de uma solução de indol (100 µg / mL) como padrão interno e o tubo foi agitado em vórtex novamente. Adicionamos 2,5 V (2,5 mL) de diclorometano frio (armazenado a -20 ° C) e o Falcon foi agitado em vórtex durante 3 min ininterruptamente e armazenado em banho de gelo por mais 5 min. Os tubos foram centrifugados a 9,5 g durante 10 min e a fase aquosa superior foi descartada. Toda a fase orgânica foi transferida para um tubo de vidro protegido da luz e seca sob fluxo de gás N₂. Para reconstituir as amostras, usamos 150 µL de uma solução contendo acetonitrila: 4 mM formiato de sódio (50:50, v/v) contendo 0,1% de ácido

fórmico, e os tubos foram agitados durante 1 min. Ao final da agitação, transferimos 100 µL para um tubo de centrifuga Spin- X, filtro 22 µM (Costar, Corning, EUA) e centrifugamos durante 3 min a 1 g. Foram injetados no equipamento 20 µL. Todo o procedimento de extração foi realizado numa câmara escura para evitar a oxidação pela luz.

As análises de TRY e DMT foram realizadas na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) em colaboração com o professor Dr. Jair Chagas. TRY e DMT foram detectados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massa (LC/MS) utilizando o equipamento 320 MS *Triple Quadrupole*, Varian®, equipado com uma fonte ESI operada no modo positivo (ESI+) . Os dados foram coletados no modo SIR ou SRM, selecionando a transição 162 > 144 para a TRY; 189 > 144 para a DMT e 118 > 89 para o padrão interno, em método cromatográfico utilizando um gradiente de formiato de amônio 4 mM formiato, contendo 0,1 % de ácido fórmico (pH~4) em água MilliQ (©Millipore), tampão A, e ácido fórmico 0,1% em acetonitrila, tampão B. O fluxo utilizado durante toda a corrida cromatográfica foi de 0,35 mL/min em uma coluna Kinetex C18 100A (50 x 4,6 mm, 2,6 mm; ©Phenomenex) acoplada a um filtro krudkatcher ultra column in-line filter (Phenomenex). O gradiente de eluição utilizado foi de: (i) 0 - 1 min (50 (A): 50 (B), v/v), (ii) 1 - 4:30 min (0 (A): 100 (B), v/v), (iii) 04:30 - 6:30 min (0 (A): 100 (B), v/v), (iv) 06:30 - 7 min (50 (A): 50 (B), v/v) e (v) 7 - 9 min (50 (A):50 (B), v/v), para reequilibrar a coluna.

3.8. METABOLIZAÇÃO DE TRY E DMT

Para avaliar a metabolização de TRY e DMT, a metodologia empregada foi a mesma utilizada para análise de biossíntese de TRY e DMT, porém, durante a análise por LC/MS, os dados foram coletados no modo SIR ou SRM, selecionando as transições 205 > 160 *m/z* e 205 > 132 *m/z* para a detecção do DMT-OH, produto hidroxilado da DMT, 221 > 176 *m/z* e

221 >148 m/z para detecção de N-N-dimetilformilquinuramina (DMFK) e o fragmento 193 > 58 m/z foi selecionado para a detecção da N-N-dimetilquinuramina (DMK). Além disso, selecionamos também as transições 265 > 178 e 237 >144, correspondente aos produtos de abertura do anel indólico da melatonina N1-acetil-N2-formil-5-metóxiquinuramina (AFMK) e N1-acetil-N2-5-metóxiquinuramina (AMK), respectivamente. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas descritas para biossíntese de TRY e DMT já que esses eram em todas as análises o foco do trabalho.

3.9. INFLUÊNCIA DOS METABÓLIDOS TRY, DMT E MLT NA METABOLIZAÇÃO DA DMT

Para avaliar a influência do precursor TRY, da própria DMT e da MLT, um metabólito antioxidante da via do TRP, na formação e metabolização de TRY e DMT, as células foram cultivadas em placas de 6 poços em uma densidade de $3,5 \times 10^5$ células/poço para a linhagem SK-Mel-19 e $2,5 \times 10^5$ células/poço para a SK-Mel-147. Respeitado o período de adesão de 24 h, as células foram tratadas com 100 μ M de TRY ou DMT ou 1 mM de MLT. Os estímulos permaneceram em contato com as culturas por 24 h, após este período o sobrenadante foi recolhido para extração e detecção de TRY, DMT e seus metabólitos, bem como para detecção de AFMK e AMK com a mesma metodologia descrita anteriormente.

3.10. EXPRESSÃO GÊNICA DE MIELOPEROXIDASE

A extração do RNA total das células foi realizada pelo Kit Rneasy (Qiagen), de acordo com protocolo recomendado pelo fornecedor. O RNA extraído foi quantificado por NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) a 260 nm e sua pureza avaliada pela absorbância nos

comprimento de onda de 260/280 nm. A síntese da fita de DNA complementar foi realizada pelo kit *SuperScript™ First-Strand synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. As células foram avaliadas quanto a expressão de *mpo* por PCR em tempo real pelo sistema TaqMan. Os iniciadores e sondas utilizados foram inventariados pela empresa Invitrogen. A expressão relativa dos genes foi calculada pelo método matemático de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

3.11. ATIVIDADE PEROXIDÁSICA

A intensidade de quimiluminescência foi acompanhada em luminômetro de microplacas brancas (Costar) em volume final de 0,3 mL. Realizamos a atividade peroxidásica com as células SK-Mel-19 e SK-Mel-147 homogeneizadas (1×10^6 células/poço) e iniciamos a reação com H_2O_2 (0,5 mM/ensaio). O luminol foi utilizado como substrato na concentração final de 1 mM. Realizamos todas as reações em PBS contendo glicose, pH 7,4, e acompanhamos por 30 min à 37°C.

3.12. EFEITO DE TRY E DMT SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS DA VIA DO TRP

As células foram cultivadas em placas de 6 poços em uma densidade de $3,5 \times 10^5$ células/poço para a linhagem SK-Mel-19 e $2,5 \times 10^5$ células/poço para a SK-Mel-147. Respeitado o período de adesão de 24h, as células foram tratadas com 100 μ M de TRY ou DMT. O RNA total foi extraído utilizando o kit RNeasy Mini kit (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante e as amostras foram congeladas a -80 °C até à utilização. Cerca

de 1 µg do RNA total foi utilizado para produção do cDNA utilizando o kit *High capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante. O PCR em tempo real foi realizado utilizando o sistema TaqMan. Os primers e sondas utilizadas adquiridos da empresa Applied Biosystems foram: Hs00266705_g1 (*gapdh*), Hs00986554_m1 (*ido1*), Hs01559141_m1 (*tph*), Hs01063209_g1 (*nat*), Hs00946627_m1 (*hiomt*), Hs01105047_m1 (*ddc*) e Hs00198941_m1 (*inmt*). Em todas as reações o GAPDH foi utilizado como controle endógeno. O método de comparação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foi utilizado para comparar as expressões de RNAm.

3.13. PRODUÇÃO DE QUINURENINA EM LINHAGENS TRATADAS COM TRY E DMT

O sobrenadante das células tratadas com 100 µM de TRY ou DMT, que foram utilizadas para os ensaios de expressão gênica, foi utilizado para extração e análise de quinurenina. Um volume de 150 µL de meio de cultura foi separado e adicionado a um microtubo âmbar de 2 mL contendo 10 V (1,5 mL) de acetonitrila gelada. Os tubos foram agitados por 1 min e acondicionados em banho de gelo por mais 1 min. Após este período, os tubos foram centrifugados por 5 min a 9,5 g. Após a precipitação de todas as proteínas, separamos todo o sobrenadante e acondicionamos em um tubo de vidro protegido da luz e a amostra foi seca sob atmosfera de gás nitrogênio. As amostras foram reconstituídas com 150 µL de água e vortexadas por 1 min, e filtradas em filtro Spin-X, 22 µm (Costar, Corning, EUA) e centrifugadas por 3 min a 1 g. Ao final do processo, 100 µL foram retirados e acondicionados nos tubos de injeção e 40 µL foram injetados em HPLC Shimadzu SCL-10A vp (Shimadzu Corporation) pela auto-injetora SIL – 10AF (Shimadzu). A cromatografia foi realizada em coluna Synergi C18 Phenomenex, (Fusion-RP, 150 x 4.60 mm, 4µm, 80A), com fase móvel acetonitrila 100% (A) e Água MilliQ (B) em um gradiente de concentração que

variou de 0 – 5 min (5 (A) : 95 (B)), 5 – 9 min (20 (A) : 80 (B)), 9 – 9,5 min (5 (A) : 95 (B)), se mantendo nessa condição inicial até 12 min. A detecção foi realizada por Detector de Arranjo de Diodos (SPD-M10A, Shimadzu) em comprimento de onda de 365 nm.

3.14. MIGRAÇÃO CELULAR

A migração celular foi avaliada nas linhagens A172, T98G, SK-Mel-19 e SK-Mel-147 por meio do teste da ferida. As células foram cultivadas em placas de 24 poços por 24 h até atingirem 95% de confluência. Após este período, fizemos cuidadosamente uma ferida com a ponta de uma pipeta de 200 µL, seguida da troca do meio de cultura com a adições dos tratamentos. As células foram tratadas com 100 µM de TRY ou DMT e fotografadas nos tempos 0, 24 e 36 h.

3.15. ENSAIO CLONOGÊNICO

O ensaio clonogênico foi realizado com os melanomas SK-Mel-19 e SK-Mel-147. Antes do tratamento, 600 células foram semeadas em placas de 60 mm e cultivadas durante 24 h. As células foram expostas a concentrações de 100 µM de TRY ou DMT e o meio de cultura contendo o tratamento foi substituído a cada 48 h. Cultivamos as células por 15 dias até a formação de colônias. No 15º dia, as culturas foram fixadas com glutaraldeído (6,0% v/v) e coradas com violeta de cristal (0,5% g/v).

3.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por *One Way ANOVA* e os resultados confirmados através de múltiplas comparações pelo teste de Tukey. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

4.1. SÍNTESE DA DMT

Uma vez que a DMT é um produto de difícil comercialização, houve a necessidade de sintetizar o composto para que os ensaios pudessem ser realizados. A síntese foi realizada a partir da triptamina conforme descrito no item Materiais e Métodos. O produto obtido foi analisado em HPLC (**Figura 9**).

Figura 9: Cromatograma do produto obtido com a síntese da DMT, usando como fase móvel EtOAc:MeOH (70:30) + 0,1% trietilamina.

A amostra foi purificada por HPLC em coluna preparativa e analisada por espectrometria de massas revelando a presença dos picos característicos da DMT. O pico com m/z 189 corresponde à molécula de DMT intacta. Os picos de m/z 58 e 144 correspondem aos fragmentos protonados do composto (**Figura 10**).

Figura 10: Espectro de massas do DMT após a purificação, análise em LC/MS do tipo *ion trap* por uma fonte de ionização por *electrospray*.

Os ensaios deste estudo foram feitos com um único lote de DMT. Ao final da purificação, foram obtidos 25,6 mg de DMT e preparadas soluções-estoque na concentração de 50 mM em metanol.

4.2. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE DE TRY E DMT

Para a realização dos ensaios celulares, uma alíquota do estoque de DMT em metanol foi seca e solubilizada em DMSO levando a uma concentração máxima de DMSO por ensaio de 0,2%, concentração essa que não apresentou citotoxicidade para nenhuma das células estudadas.

Os ensaios de citotoxicidade de TRY e DMT foram acompanhados pelo teste de MTT em linhagens de glioma humano A172 e T98G; em células de neuroblastoma de camundongo Neuro 2A; nas linhagens de melanoma humano SK-Mel-19 e SK-Mel-147 e em monócitos de sangue periférico humano. DMT não apresentou toxicidade para nenhuma das células estudadas, enquanto TRY, nas concentrações de 50 e 100 μ M, foi tóxica somente para a linhagem Neuro 2A (**Figura 11**).

Figura 11: Viabilidade das linhagens A172; T98G; Neuro-2A; SK-Mel-19 e SK-Mel-147 e de cultura primária de monócitos após 24h de exposição a 10; 50 e 100 μM de TRY ou DMT. (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$.

Um estudo mostrou que TRY nas concentrações de 100 μM a 1 mM induz autofagia nas linhagens de células nervosa HT22 e SK-N-SH e em cultura primária de astrócitos, sendo que células gliais foram menos sensíveis que os neurônios (Herrera, Martin *et al.*, 2006). Comportamento similar pode ser visto com as células que estudamos; a linhagem neuronal Neuro 2A foi a única sensível ao composto.

É sugerido que triptamina e seus derivados, em concentrações fisiológicas, modulam a função cerebral alterando a sensibilidade neuronal a neurotransmissores de monoamina, no entanto, em concentrações farmacológicas têm propriedades parecidas com a das anfetaminas (Berry, 2004). As anfetaminas causam autofagia em células neuronais e este tipo de morte celular tem sido relacionado a doenças neurodegenerativas. Assim, é sugerido que as triptaminas também possam desempenhar algum papel em distúrbios cerebrais (Berry, 2004; Nixon, Wegiel *et al.*, 2005)

A partir dos testes de citotoxicidade, foi possível padronizar as concentrações de TRY e DMT a serem utilizadas nos ensaios a seguir, sendo definida a concentração de 100 μ M para ambos os compostos.

4.3. EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS DA VIA DAS TRIPTAMINAS

As expressões das enzimas aminoácido aromático descarboxilase (DDC) e indoletilamina-N-metiltransferase (INMT) foram avaliadas em culturas primárias de fibroblastos, queratinócitos e melanócitos humanos e nas linhagens humanas de melanomas SK-Mel-19 e SK-Mel-147 e gliomas A172 e T98G.

Em nossas condições de ensaio, a enzima DDC, foi encontrada apenas na linhagem de melanoma SK-Mel-147 (**Figura 12**), já a INMT foi encontrada em fibroblastos, SK-Mel-147 e A172 (**Figura 13**). Dentre estas, a linhagem SK-Mel-147 apresentou a expressão relativa de *inmt* mais elevada.

Figura 12: Expressão relativa do gene *ddc* da via de produção do DMT por PCR em tempo real em cultura primária de fibroblasto, queratinócito e melanócitos humanos e em linhagens de melanomas humanos SK-Mel-19 e SK-Mel-147, bem como em linhagens de gliomas humanos A172 e T98G. A análise comparativa foi feita em relação a expressão do gene *idol* da linhagem A172. O gene *gapdh* foi utilizado como calibrador da reação e o método comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foi utilizado para comparar os níveis de expressão de RNAm.

Figura 13: Expressão realtiva do gene *inmt* da via de produção do DMT por PCR em tempo real em cultura primária de fibroblasto, queratinócito e melanócitos humanos e em linhagens de melanomas humanos SK-Mel-19 e SK-Mel-147, bem como em linhagens de gliomas humanos A172 e T98G. A análise comparativa foi feita em relação a expressão do gene *ido1* da linhagem A172. O gene *gapdh* foi utilizado como calibrador da reação e o método comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foi utilizado para comparar os níveis de expressão de RNAm.

No cérebro, a enzima DDC esta presente em neurônios monoaminérgicos e células astrogliais, sendo responsável pela síntese de amina traço e pela produção das monoaminas neurotransmissoras dopamina e serotonina. A enzima também está expressa no rim, fígado, pulmão e trato gastrointestinal, porém muitas funções nesse órgãos ainda não são definidas (Allen, Land *et al.*, 2009). Atualmente, sabe-se que a enzima INMT é altamente expressa em tireóide, glândula adrenal e pulmões humanos. Concentrações intermediárias de expressão são encontradas em coração, músculo esquelético, traquéia, estômago, intestino delgado, pâncreas, testículos, próstata, placenta, linfonodos e medula espinhal; os órgãos fígado, baço, rim, cólon, ovário e medula óssea apresentam expressões muito baixas da enzima (Thompson, Moon *et al.*, 1999). Apesar da descrição de DDC e INMT nos órgãos mencionados acima, estas enzimas nunca antes haviam sido descritas em melanoma humano.

A partir destes resultados, optamos por utilizar como modelo de estudo nos ensaios de biossíntese e metabolismo de TRY e DMT a linhagem de melanoma SK-Mel-147, pois foi a

única que apresentou a expressão de ambas as enzimas da via de síntese de DMT. A fim de estabelecer um perfil comparativo entre células representativas de um mesmo tipo de tumor, os ensaios de biossíntese e metabolismo também foram realizados com a linhagem de melanoma SK-Mel-19.

4.4. BISSÍNTESE DE TRY E DMT POR LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS

A partir dos resultados obtidos com a expressão gênica das enzimas da via da DMT, investigamos a produção basal de TRY e DMT pelas células SK-Mel-19 e SK-Mel-147 (**Figura 14**). TRY foi encontrada no sobrenadante celular da SK-Mel-19 e DMT estava presente nas duas linhagens.

Figura 14: Biossíntese de TRY e DMT em melanomas. A figura ilustra produção de TRY e DMT em células de melanoma humano SK-Mel-19 e SK-Mel-147. As células foram semeadas em placas de 6 poços e 24h após o período de adesão, TRY e DMT foram extraídos do sobrenadante das culturas utilizando-se diclorometano. A biossíntese dos compostos foi caracterizada por LC/MS do tipo triplo quadrupolo. Em todas as análises o indol foi utilizado como padrão interno. (*) $P < 0,05$.

Como se vê não houve uma correlação entre a expressão relativa das enzimas envolvidas na síntese de TRY e DMT com a presença destes metabólitos nas células; isto é, para a SK-Mel-19 não se observa expressão de *ddc* ou *inmt*, no entanto, observa-se a presença de TRY e DMT. Este dado pode ser explicado pela padronização realizada nos ensaios de

PCR em tempo real, pois para todos os ensaios utilizamos a concentração de 10 ng cDNA nas reações, porém, como a expressão destas enzimas na SK-Mel-19 deve ser muito baixa, esta concentração de cDNA pode ter sido insuficiente para se obter uma amplificação, sendo o resultado obtido como indeterminado.

Outra aparente incoerência é o fato de que para a célula SK-Mel-147, apesar de haver a expressão de *ddc* e *inmt* não há TRY detectável. Como estas triptaminas possuem um rápido *turnover*, é possível que taxas de metabolização de vias subsequentes estejam operando. Por exemplo, sabe-se que modificações na atividade de monoamino oxidase (MAO) alteram as concentrações estacionárias de aminas traço (Yritia, Riba *et al.*, 2002). Assim, sendo o metabolismo rápido, observaríamos outros metabólitos da via e não a TRY intacta.

TRY e DMT são conhecidas como aminas traço por estar em concentrações muito baixas em tecidos de mamíferos, por exemplo, no pulmão e no rim de humanos, foram encontradas concentrações de DMT de 14 e 15 ng/kg, respectivamente (Karkkainen, Forsstrom *et al.*, 2005). Em nossas análises, as concentrações de TRY e DMT encontradas em melanomas também foram baixas, da ordem de pico molar, abaixo do padrão de linearidade do equipamento, por isso não foram quantificadas ($S/R < 10$), porém este é um achado importante cujo papel em células tumorais merece ser avaliado.

4.5. METABOLIZAÇÃO DE TRY E DMT

Sabe-se que TRY é convertida à metiltriptamina e DMT, mas pouco se sabe sobre a metabolização da DMT. Um estudo recente do grupo mostrou que a DMT pode ser degradada gerando um produto hidroxilado (DMT-OH) e os produtos de abertura do anel indólico análogos da quinurenina N-N-dimetilformilquinuramina (DMFK) e N-N-dimetilquinuramina (DMK) (Gomes, 2008). Assim, avaliamos a presença destes produtos no sobrenadante das

culturas celulares. Além disso, verificamos também a presença dos produtos de abertura do anel indólico da melatonina AFMK e AMK nas culturas a fim de estabelecer um comparativo da produção de análogos de quinurenina nestas linhagens (**Figura 15**).

Figura 15: Metabolização da DMT. A figura ilustra a formação dos produtos de metabolização da DMT, DMT-OH; DMFK e DMK bem como os metabólitos de melatonina AFMK e AMK por linhagens de melanoma humano SK-Mel-19 e SK-Mel-147 nas mesmas condições mencionadas na figura 14. (***) $P < 0.001$.

Ambas as linhagens são capazes de metabolizar TRY e DMT no estado basal. O produto de abertura do anel indólico DMFK foi detectado nas duas linhagens, porém, para SK-Mel-147, verificamos que a quantidade produzida é bem maior, sugerindo que a atividade peroxidásica destas células pode ser mais elevada que na SK-Mel-19. Em acordo com esta hipótese, observamos a produção do metabólito da melatonina AFMK somente nestas células, na SK-Mel-19, só é encontrado a forma deformilada deste metabólito, o AMK. Estes dados reforçam também a hipótese mencionada anteriormente sobre a ausência de TRY na linhagem SK-Mel-147, pois apesar de não ser observada a TRY intacta, conseguimos detectar quantidades muito superiores de DMFK nesta linhagem em comparação com a SK-Mel-19, indicando um rápido *turnover* nestas células.

O fato de TRY e DMT levarem a formação de produtos de abertura do anel indólico é interessante, pois assim como a formação de AFMK em sítios inflamatórios tem papel na imunomodulação (Silva, S., Ximenes, V. *et al.*, 2000; Silva, Rodrigues, Carvalho *et al.*, 2004;

Silva, Rodrigues, Ximenes *et al.*, 2004), o DMFK pode ter um papel biológico importante ainda não descrito.

4.6. INFLUÊNCIA DOS METABÓLITOS TRY, DMT E MLT NA METABOLIZAÇÃO DA DMT

Na tentativa de entender um pouco mais sobre a regulação da via das triptaminas por metabólitos do triptofano, avaliamos a metabolização da DMT na presença de TRY, precursor da DMT, na presença do próprio DMT e na presença de melatonina, um metabólito do TRP com atividade antioxidante. Para facilitar o entendimento, primeiramente iremos abordar os metabólitos clássicos da via das triptaminas, TRY, DMT e AIA (**Figura 16**).

Figura 16: Metabolização da DMT. A figura ilustra a formação dos metabólitos TRY, DMT e AIA na ausência de tratamento, na presença de 100 μ M de TRY ou DMT e na presença de 1 mM de MLT durante 24h. Os metabólitos foram extraídos do sobrenadante das linhagens de melanoma SK-Mel-19 e SK-Mel-147 e analisados por LC/MS do tipo triplo quadrupolo (320 MS, Varian). O indol foi utilizado como padrão interno durante as análises. (#) $P < 0.05$; (##) $P < 0.01$; (###) $P < 0.001$ -comparação em relação ao controle; (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$; (***) $P < 0.001$ -comparação entre as células SK-Mel-19 e SK-Mel-147.

A partir dos dados apresentados acima (**Figura 16**), verificamos que quando as células são tratadas com 100 μ M do precursor TRY, há um aumento significativo da quantidade de DMT produzida apenas na linhagem SK-Mel-19, mas não na SK-Mel-147. Este aumento era esperado, pois estamos fornecendo mais substrato para que ocorra a metilação do composto. Um dado curioso foi que apesar quantidade de DMT não ter aumentado na SK-Mel-147, verificamos a presença do metabólito AIA, possivelmente a DMT nesta célula esta sendo degradada mais rapidamente em outros possíveis metabólitos da via.

Quando a DMT é adicionada ao meio de cultura, existe uma maior produção de TRY pela linhagem SK-Mel-19 e estas células passam a produzir AIA. O perfil de metabolização da célula SK-Mel-147 não é alterado, e a célula continua a não produzir TRY, mostrando que as duas linhagens tem preferências distintas quanto à formação de metabólitos da DMT quando analisadas nas mesmas condições.

Quando as células são tratadas com MLT, verificamos que há um aumento discreto na produção de DMT e TRY na SK-Mel-19, e um aumento de DMT bem mais significativo na linhagem SK-Mel-147. Uma possível explicação para este fato pode ser devido à ação antioxidante da MLT que poderia proteger a DMT da degradação nestas células.

Os metabólitos da DMT, DMT-OH, DMFK e DMK, descritos por nosso grupo de pesquisa e os produtos de abertura do anel indólico da MLT, AFMK e AMK também foram analisados nas mesmas condições apresentadas anteriormente (**Figura 17**).

Figura 17: Metabolização da DMT. A figura ilustra a formação dos metabólitos de DMT, DMT-OH; DMFK e DMK e dos metabólitos da melatonina AFMK e AMK nas mesmas condições da figura 16.

Como já mencionado, as duas linhagens estudadas são capazes de metabolizar a DMT formando DMFK no estado basal, porém, a SK-Mel-147, parece formar muito mais produtos de abertura do anel. Quando as células são tratadas com TRY, há um aumento de produção do DMFK pela linhagem SK-Mel-19, e este efeito não é observado na SK-Mel-147, porém, estas últimas passam a produzir o produto hidroxilado DMT-OH, evidenciando novamente a diferença no perfil de metabolização das células estudadas.

Ao realizar o tratamento com DMT, o perfil de metabolização para as duas linhagens se assemelha ao observado com o tratamento por TRY, chamando atenção novamente, a produção de DMT-OH pela SK-Mel-147 também nesta condição.

Quando a MLT é adicionada, o pico de DMFK produzido pela célula SK-Mel-19 desaparece completamente, o mesmo não acontece para a linhagem SK-Mel-147 que permanece com as quantidades de DMFK inalteradas em relação ao controle. Também na presença deste tratamento, verificamos a produção de DMT-OH por parte da linhagem SK-Mel-147, além disso, foi encontrada uma pequena quantidade do produto deformilado da DMT, o DMK, que não apareceu nas outras condições estudadas. Como já esperado, os picos

de AFMK e AMK aumentaram significativamente, pois houve a adição de mais substrato para ser oxidado. Como peroxidases também são responsáveis pela formação dos metabólitos de melatonina AFMK e AMK, o aumento de DMT nas linhagens quando as células são tratadas com melatonina (**Figura 14**) poderia se explicado não só pelo poder antioxidante do composto, mas também pela competição da melatonina com a DMT por sítios de ligação a essas enzimas.

4.7. EXPRESSÃO GÊNICA DE MIELOPEROXIDASE E ATIVIDADE PEROXIDÁSICA

Tendo em vista todos os resultados de metabolismo, percebemos que a linhagem SK-Mel-147 forma mais produtos de abertura do anel indólico do que a linhagem SK-Mel-19, além disso, apenas estas células foram capazes de produzir o composto hidroxilado DMT-OH. Uma hipótese para esta diferença no metabolismo das linhagens é de que as células apresentam quantidades distintas de mieloperoxidase (MPO), pois como descrito pelo grupo, um dos mecanismos de formação dos produtos de abertura do anel indólico e DMT-OH pode ser via MPO. Dessa forma, analisamos a expressão gênica de MPO por PCR em tempo real nas células em estado basal e tratadas com TRY e DMT (**Figura 18**) e avaliamos a atividade peroxidásica das células em estado basal (**Figura 19**).

Figura 18: Expressão realtiva do gene *mpo* pelas linhagens SK-Mel-19 e SK-Mel-147 na ausência de estímulo e na presença de 100 μ M de TRY ou DMT por PCR em tempo real. A análise comparativa foi feita em relação a expressão do gene *ido1* da linhagem SK-Mel-147. O gene *gapdh* foi utilizado como calibrador da reação.

Figura 19: Atividade peroxidásica dos melanomas SK-Mel-19 e SK-Mel-147. 1×10^6 células foram incubadas com 0,5 mM de H₂O₂ e 1 mM de luminol. O meio de reação utilizado foi PBS glicosilado, pH 7,4 e temperatura 37°C. (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$ em relação ao controle de células.

Nas condições analisadas, não foi encontrada expressão de MPO na linhagem SK-Mel-19 nem mesmo quando as células eram tratadas com TRY ou DMT. Porém, houve

expressão de MPO para a linhagem SK-Mel-147, sendo que esta não foi alterada com a adição de TRY ou DMT ao meio de cultura. Em relação à atividade peroxidásica, percebemos que ambas as células possuem atividade peroxidásica, pois a emissão de luz para as duas células é muito maior que a dos controles, porém, pelo gráfico (**figura 19**) percebemos que as células SK-Mel-19 e SK-Mel-147 não aparentam diferença quanto a atividade peroxidásica.

4.8. EFEITO DE TRY E DMT SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS DA VIA DO TRP

Vários estudos do nosso grupo de pesquisa indicaram que as três vias de degradação do TRP interagem entre si. Por exemplo, recentemente, foi mostrado que TRY e DMT inibem a enzima IDO e, conseqüentemente, diminuem a produção de quinurenina em linhagem de glioma humano A172 (Tourino, 2012). Assim, avaliamos se TRY e DMT poderiam alterar a expressão gênica das enzimas envolvidas nas rotas de metabolização do TRP. As células SK-Mel-19 e SK-Mel-147 foram tratadas com estes compostos e realizamos o PCR em tempo real das enzimas indoleamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO1); triptofano hidroxilase (TPH); N-acetiltransferase (NAT); hidróxi-indol-O-metiltransferase (HIOMT); aminoácido aromático descarboxilase (DDC) e indoletilamina-N-metiltransferase (INMT) (**Figura 20**).

Figura 20: Expressão gênica das enzimas IDO1, TPH, NAT, HIOMT, DDC e INMT das rotas de degradação do TRP na ausência de estímulo e na presença de 100 µM de TRY ou DMT por PCR em tempo real. O gene *gapdh* foi utilizado como calibrador da reação. A análise comparativa foi feita em relação a expressão do gene *ido1* na linhagem SK-Mel-147. O método comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foi utilizado para comparar os níveis de expressão de RNAm. (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$; (***) $P < 0.001$.

Verificamos que nas células SK-MEL-19, TRY e DMT diminuíram a expressão do gene *ido1*, sendo possível que TRY e DMT reduzam a formação quinurenina nestas células. No que diz respeito SK-MEL-147, apenas TRY diminuiu a expressão de *ido1*, a DMT ao contrário, aumentou a expressão da enzima. Nesta mesma linhagem, TRY e DMT foram capazes de reduzir a expressão da enzima NAT, indicando que a produção de MLT pode ser prejudicada nestas condições. Por fim, analisamos a influencia de TRY e DMT na própria via metabólica e verificamos que na linhagem SK-Mel-19, mesmo na presença destes metabólitos, não há expressão de *ddc* e *inmt* nas nossas condições de análise. No entanto, já em relação a linhagem SK-Mel-147, obeservamos que o tratamento com DMT aumenta significativamente a expressão da enzima *ddc*, o poderia significar uma maior produção de triptamina nesta condição. Porém, como já mencionado, não conseguimos detectar TRY no sobrenadante das células SK-Mel-147 tratadas com DMT, o que foi observado por nosso grupo foi a presença de outros metabólitos da via, como o DMFK, em grande quantidade.

Embora dados da literatura afirmem que a DMT possa inibir a atividade da enzima INMT em coelhos (Thompson e Weinshilboum, 1998), não observamos nenhuma alteração na expressão do gene *inmt* com a adição dos nossos tratamentos.

4.9. PRODUÇÃO DE QUINURENINA EM LINHAGENS TRATADAS COM TRY E DMT

Como a expressão de *ido1* diminuiu quando as células SK-Mel-19 foram tratadas com DMT e TRY, verificamos se o efeito se reproduzia sobre o metabolismo analisando a produção de quinurenina (QUIN) por HPLC nas células SK-Mel-19 e SK-Mel-147 (**Figura 21**).

Figura 21: Produção de quinurenina (µM) pelas células SK-Mel-19 e SK-Mel-147 tratadas com 100 µM de TRY ou DMT por um período de 24 h. (**) $P < 0.01$; (***) $P < 0.001$.

Contrário ao esperado com os resultados de expressão gênica de *ido1*, a produção de QUIN na linhagem SK-Mel-19 não é afetada pelo tratamento com TRY ou DMT, as concentrações deste metabólito permanecem iguais as do controle. Já nas células SK-Mel-147, verificamos um pequeno aumento na formação de QUIN quando adicionamos TRY e DMT ao meio de cultura, contradizendo os resultados de expressão obtidos com o tratamento por TRY e afirmando os dados de expressão em relação à adição de DMT, onde verificamos

que estes compostos diminuem e aumentam, respectivamente a expressão de *ido1* na linhagem SK-Mel-147.

Comparando a produção de QUIN entre as linhagens, percebemos que as células SK-Mel-147 produzem quase duas vezes mais este metabólito do que a SK-Mel-19. Quando analisamos o perfil de proliferação celular destas duas linhagens, verificamos que a SK-Mel-147, que produz mais QUIN, prolifera mais rapidamente do que a SK-Mel-19. Estes dados sugerem que talvez QUIN esteja correlacionada com o perfil mais agressivo de proliferação desta linhagem. A correlação entre proliferação celular e QUIN já foi realizada em um estudo com gliomas humanos, onde durante o ensaio clonogênico a adição deste metabólito aumento da motilidade e malignidade celular (Opitz, Litzenburger *et al.*, 2011).

4.10. ATIVIDADES ANTITUMORAIS

Sabendo que vários metabólitos do TRP modificam a proliferação tumoral, e que TRY e DMT foram capazes de inibir a atividade de IDO, possuindo, portanto um efeito indireto como agente antitumoral, investigamos se estes compostos poderiam atuar diretamente no tumor impedindo a migração e/ou proliferação de células tumorais. O teste da ferida foi realizado nos gliomas humanos A172 (**Figura 22**) e T98G (**Figura 23**) e nos melanomas SK-Mel-19 (**Figura 24**) e SK-Mel-147 (**Figura 25**) tratados com TRY ou DMT. Este ensaio foi utilizado para verificar a capacidade de migração celular na presença dos tratamentos.

Figura 22: Imagens de microscopia óptica de migração celular de gliomas humanos A172 em 24 e 36h e painéis mostrando a quantificação da percentagem de migração das células após tratamento com 100 μ M de TRY ou DMT. Células cultivadas apenas com meio foram apresentadas como controle de referência.

Figura 23. Imagens de microscopia óptica de migração celular de gliomas humanos T98G em 24 e 36h e painéis mostrando a quantificação da percentagem de migração das células após tratamento com 100 μM de TRY ou DMT. Células cultivadas apenas com meio foram apresentados como controle de referência.

Figura 24: Imagens de microscopia óptica de migração celular de melanomas humanos SK-Mel-19 em 24 e 36h e painéis mostrando a quantificação da percentagem de migração das células após tratamento com 100 μ M de TRY ou DMT. Células cultivadas apenas com meio foram apresentadas como controle de referência.

Figura 25: Imagens de microscopia óptica de migração celular de melanomas humanos SK-Mel-147 em 24 e 36h e painéis mostrando a quantificação da percentagem de migração das células após tratamento com 100 μ M de TRY ou DMT. Células cultivadas apenas com meio foram apresentadas como controle de referência.. (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$.

Os ensaios mostraram que não houve diferença estatística entre a área migrada do controle e dos tratamentos com TRY ou DMT para as linhagens A172, T98G e SK-Mel-19. No entanto, quando analisamos as células de melanoma humano SK-Mel-147, verificamos que houve uma menor migração celular quando as mesmas foram tratadas com TRY ou DMT.

Com as imagens de microscopia óptica (**Figura 25**), percebemos que após 36 h, uma parte da ferida é fechada no controle, porém, quando as células recebem os tratamentos a ferida permanece aberta. A redução da migração pode ser comprovada pela representação gráfica da área migrada, onde o teste estatístico empregado demonstrou a ocorrência de significância em relação ao controle quando os tratamentos foram realizados. Com o gráfico, podemos perceber ainda que a redução da migração foi mais significativa quando as células foram tratadas com TRY ($p<0,01$) do que quando tratadas com DMT ($p<0,05$). A redução da migração pode ser verificada com 24 h de ensaio e o padrão se manteve o mesmo em 36 h.

Além de estudar a migração celular, realizamos também o ensaio clonogênico para verificar a proliferação das células tumorais na presença de TRY ou DMT. Para este ensaio foram escolhidas as células SK-Mel-147, por apresentar sensibilidade no teste de migração, e as células SK-Mel-19 para comparar como diferentes linhagens de um mesmo tumor se comportam diante os tratamentos (**Figura 26**).

Figura 26: Ensaio clonogénico. Imagem da formação de colónias em células de melanoma humano SK-MEL-19 e SK-MEL-147 tratados com 100 μ M de TRY ou DMT de 2 em 2 dias, durante 14 dias . As células do controle foram cultivadas apenas com meio culturas acrescido de 0,2% de DMSO.

Apesar de não ter sido observada diferença na migração celular para as células SK-Mel-19, houve uma brusca redução na proliferação quando as mesmas foram tratadas com TRY ou DMT em comparação com o controle, com estes tratamentos não foi observada a formação de colônias de células. Na linhagem SK-Mel-147 também houve uma redução na proliferação, porém as colônias ainda podiam ser identificadas, sendo assim, o efeito foi menos pronunciado que na SK-Mel-19. Pelas imagens (**Figura 26**), percebemos que a SK-Mel-147 foi mais sensível a TRY do que ao DMT. Este foi o primeiro trabalho a mostrar uma atividade antitumoral de TRY e DMT, porém mais estudos são necessários para demonstrar como essas triptaminas exercem essa ação em melanomas.

Uma hipótese que será investigada futuramente por nosso grupo de pesquisa é a possibilidade de TRY e DMT exercerem a sua ação antitumoral devido à ligação ao receptor de aril hidrocarbonetos (AHR), pois em 1998 estudos mostraram que metabólitos do TRP poderiam se ligar a este receptor (Heath-Pagliuso, Rogers *et al.*, 1998). Além disso, um estudo recente demonstrou que o mecanismo de imunoescape tumoral mediado por QUIN em

gliomas é dependente da ligação deste metabólito ao AHR (Opitz, Litzenburger *et al.*, 2011). Sendo assim, acreditamos que TRY e DMT também poderiam se ligar a este receptor competindo com QUIN pelos sítios de ligação e impedindo que a mesma de exercer sua ação.

5. Conclusões

As principais conclusões deste trabalho são que:

- As células de melanoma humano SK-Mel-19 e SK-Mel-147 são capazes de sintetizar e metabolizar TRY e DMT;
- TRY e DMT se mostraram atóxicos na concentração de 100 μ M e tempo de exposição de 24 h para as células de glioma humano A172 e T98G, bem como para os melanomas SK-Mel-19 e SK-Mel-147 e para a cultura primaria de monócitos e foram pouco citotóxicos para a linhagem de neuroblastoma de camundongo Neuro-2A;
- A expressão das enzimas da via da DMT não é uma característica das células tumorais. A linhagem de melanoma humano SK-Mel-147 expressou ambas as enzimas da via do DMT e a SK-Mel-19 não foi capaz de expressar nenhuma dessas enzimas. Houve expressão de *inmt* também pela cultura de primária de fibroblastos e pela linhagem de glioma A172;
- As linhagens de melanoma SK-Mel-19 e SK-Mel-147 tem perfis de metabolização de DMT diferentes, sendo que a SK-Mel-147, tende a formar mais produtos de abertura do anel indólico, o que pode ser explicado pela expressão de mieloperoxidases nestas células;
- TRY, DMT e MLT foram capazes de alterar o perfil de metabolização de TRY e DMT nas linhagens de melanomas estudadas;
- O tratamento das linhagens com TRY e DMT impactou sobre a expressão gênica de algumas enzimas de outras vias de metabolização do TRP, demonstrando que as rotas podem interagir entre elas;
- TRY e DMT não alteraram a formação de quinurenina na linhagem SK-Mel-19, porém este efeito foi observado nas células SK-Mel-147;

- TRY e DMT diminuíram a migração das células SK-Mel-147, mas não da SK-Mel-19, porém ambos os compostos reduziram significativamente a proliferação tumoral, exercendo assim um efeito antitumoral direto sobre os melanomas estudados.

6. Referências

ALLEN, G. F. G.; LAND, J. M.; HEALES, S. J. R. A new perspective on the treatment of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 97, n. 1, p. 6-14, May 2009. ISSN 1096-7192. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000265428000003 >.

AXELROD, J. Enzymatic formation psychotomimetic metabolites from normally occurring compounds. **Science**, v. 134, 1961.

BELLADONNA, M. L. et al. Kynurenine pathway enzymes in dendritic cells initiate tolerogenesis in the absence of functional IDO. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 1, p. 130-137, Jul 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000238471400020 >.

BELLADONA, M.L. et.al. Immunosuppression via tryptophan catabolism: The role of kynurenine pathway enzymes. **Transplantation**, v. 84, n. 1, p. S17-S20, Jul 2007. ISSN 0041-1337. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000248151800006 >.

BERRY, M. D. Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators. **Journal of Neurochemistry**, v. 90, n. 2, p. 257-271, Jul 2004. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222422000001 >.

BOROWSKY, B., ET AL. Trace amines: identification of a family of mammalia protein-coupled receptors. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2001.

BOULTON, A. A. Identification, distribution, metabolism and function of m- and p-tyramine, phenylethylamine and tryptamine in brain. **Adv. Biochem. Psychopharmacol**, 1976.

BOULTON, A. A., AND JUORIO, A. V. **Handbook of Neurochemistry**. New York: Plenum Press, 1982.

BOYLAND, E., WILLIAMS, D.C. The estimation of tryptophan metabolites in the urine of patients with cancer of the bladder. **Process Biochem**, 1955.

BRODY, J. R. et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival. **Cell Cycle**, v. 8, n. 12, p. 1930-1934, Jun 2009. ISSN 1538-4101. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000266955000027 >.

BURCHETT, S. A.; HICKS, T. P. The mysterious trace amines: Protean neuromodulators of synaptic transmission in mammalian brain. **Progress in Neurobiology**, v. 79, n. 5-6, p. 223-246, Aug 2006. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241467800001 >.

CARPENTIERI, A. et al. New perspectives in melatonin uses. **Pharmacological Research**, v. 65, n. 4, p. 437-444, Apr 2012. ISSN 1043-6618. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000302759900005 >.

CEREA, G. et al. Biomodulation of cancer chemotherapy for metastatic colorectal cancer: a randomized study of weekly low-dose irinotecan alone versus irinotecan plus the oncostatic pineal hormone melatonin in metastatic colorectal cancer patients progressing on 5-fluorouracil-containing combinations. **Anticancer Research**, v. 23, n. 2C, p. 1951-1954, Mar-Apr 2003. ISSN 0250-7005. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000183471900050 >.

COSTA, M. C., M C FIGUEIREDO, E S OS CAZENAVE. Ayahuasca: uma abordagem toxicológica do uso ritualístico. **Rev Psiquiatr Clín**, v. 32, n. 6, 2005.

DAI, H. H.; DAI, Z. H. The role of tryptophan catabolism in acquisition and effector function of memory T cells. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 13, n. 1, p. 31-35, Feb 2008. ISSN 1087-2418. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000253115000007 >.

DZIEGIEL, P.; PODHORSKA-OKOLOW, M.; ZABEL, M. Melatonin: Adjuvant therapy of malignant tumors. **Medical Science Monitor**, v. 14, n. 5, p. RA64-RA70, May 2008. ISSN 1234-1010. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000256199200020 >.

EASTMAN, C. L.; GUILARTE, T. R. THE ROLE OF HYDROGEN-PEROXIDE IN THE INVITRO CYTOTOXICITY OF 3-HYDROXYKYNURENINE. **Neurochemical Research**, v. 15, n. 11, p. 1101-1107, Nov 1990. ISSN 0364-3190. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1990EW48500009 >.

FARRIOL, M. et al. In vitro effects of melatonin on cell proliferation in a colon adenocarcinoma line. **Journal of Applied Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 21-24, Jan-Feb 2000. ISSN 0260-437X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000085357800003 >.

FONTANILLA, D. et al. The Hallucinogen N,N-Dimethyltryptamine (DMT) Is an Endogenous Sigma-1 Receptor Regulator. **Science**, v. 323, n. 5916, p. 934-937, Feb 2009. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263295400042 >.

FRANZEN, F.; GROSS, H. TRYPTAMINE N,N-DIMETHYLTRYPTAMINE N,N-DIMETHYL-5-HYDROXYTRYPTAMINE AND 5-METHOXYTRYPTAMINE IN HUMAN BLOOD AND URINE. **Nature**, v. 206, n. 4988, p. 1052-&, 1965. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A19656497600062 >.

FURTMULLER, P. G. et al. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, n. 2, p. 199-213, Jan 2006. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234961500002 >.

GABLE, R. S. Risk assessment of ritual use of oral dimethyltryptamine (DMT) and harmala alkaloids. **Addiction**, v. 102, n. 1, p. 24-34, Jan 2007. ISSN 0965-2140. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000242957900006 >.

GODIN-ETHIER, J. et al. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression in Human Cancers: Clinical and Immunologic Perspectives. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 22, p. 6985-6991, Nov 2011. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000297158500006 >.

GOMES, M. M. **Dietilamina do ácido lisérgico (LSD) e N-N-dimetiltriptamina (DMT) como substratos de peroxidases: uma possível rota de metabolização: Tese de mestrado:Universidade de São Paulo** 2008.

HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, W. M. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, n. 2, p. 214-224, Jan 2006. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234961500003 >.

HAPTOM, M. B., A KETTLE, E C C WINTERBOURN. Inside the neutrophils phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. **Blood**, 1998.

HEATH-PAGLIUSO, S. et al. Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. **Biochemistry**, v. 37, n. 33, p. 11508-11515, Aug 1998. ISSN 0006-2960. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000075516100014 >.

HERRERA, F. et al. Tryptamine induces cell death with ultrastructural features of autophagy in neurons and glia: Possible relevance for neurodegenerative disorders. **Anatomical Record Part a-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology**, v. 288A, n. 9, p. 1026-1030, Sep 2006. ISSN 1552-4884. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000240295400011 >.

HIRATA, F. et al. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. **J Biol Chem**, v. 249, n. 4, p. 1311-3, Feb 1974. ISSN 0021-9258. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4814344 >.

HOFFER, A. *Onlin.Pharmacol.Ther*, 1965.

HRYHORCZUK, L. M. et al. A NEW METABOLIC PATHWAY FOR N,N-DIMETHYLTRYPTAMINE. **Biological Psychiatry**, v. 21, n. 1, p. 84-93, Jan 1986. ISSN 0006-3223. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1986AVV5000009 >.

INO, K. et al. Inverse correlation between tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: Its association with disease progression and survival. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 8, p. 2310-2317, Apr 2008. ISSN 1078-0432. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000254943600009 >.

JACOB, M. S.; PRESTI, D. E. Endogenous psychoactive tryptamines reconsidered: an anxiolytic role for dimethyltryptamine. **Medical Hypotheses**, v. 64, n. 5, p. 930-937, 2005. ISSN 0306-9877. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000228107500007 >.

JANTSCHKO, W. et al. Redox intermediates of plant and mammalian peroxidases: A comparative transient-kinetic study of their reactivity toward indole derivatives. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 398, n. 1, p. 12-22, Feb 2002. ISSN 0003-9861. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000173661000003 >.

KAPLAN, J. et al. BLOOD AND URINE LEVELS OF N,N-DIMETHYLTRYPTAMINE FOLLOWING ADMINISTRATION OF PSYCHOACTIVE DOSAGES TO HUMAN SUBJECTS. **Psychopharmacologia**, v. 38, n. 3, p. 239-245, 1974. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1974U205800006 >.

KARKKAINEN, J. et al. Potentially hallucinogenic 5-hydroxytryptamine receptor ligands bufotenine and dimethyltryptamine in blood and tissues. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, v. 65, n. 3, p. 189-199, Apr 2005. ISSN 0036-5513. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000228957100003 >.

KLIVENYI, P.; TOLDI, J.; WECSEI, L. Kynurenines in neurodegenerative disorders: Therapeutic consideration. **Frontiers in Clinical Neuroscience: Neurodegeneration and Neuroprotection: a Symposium in Abel Lajtha's Honour**, v. 541, p. 169-183, 2004. ISSN 0065-2598. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000187551800010 >.

LIPINSKI, J. F. et al. BLOOD DIMETHYLTRYPTAMINE CONCENTRATIONS IN PSYCHOTIC DISORDERS. **Biological Psychiatry**, v. 9, n. 1, p. 89-91, 1974. ISSN 0006-3223. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1974W280700009 >.

LORIA, V. et al. Myeloperoxidase: A new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. **Mediators of Inflammation**, 2008. ISSN 0962-9351. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000255947100001 >.

MAES, M. et al. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. **Metabolic Brain Disease**, v. 24, n. 1, p. 27-53, Mar 2009. ISSN 0885-7490. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263381200004 >.

MAVLYUTOV, T. A. et al. DEVELOPMENT OF THE SIGMA-1 RECEPTOR IN C-TERMINALS OF MOTONEURONS AND COLOCALIZATION WITH THE N,N'-DIMETHYLTRYPTAMINE FORMING ENZYME, INDOLE-N-METHYL TRANSFERASE. **Neuroscience**, v. 206, p. 60-68, Mar 2012. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000302202900007 >.

MULLER, A. J.; SCHERLE, P. A. Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors (vol 6, pg 613, 2006). **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 9, Sep 2006. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000240025600022 >.

MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1147-1154, May 2007. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000246347000005 >.

NIXON, R. A. et al. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: An immunoelectron microscopy study. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 64, n. 2, p. 113-122, Feb 2005. ISSN 0022-3069. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000227106700003 >.

OKUDA, S. et al. 3-hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. **Journal of Neurochemistry**, v. 70, n. 1, p. 299-307, Jan 1998. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000071146400035 >.

OON, M. C., MURRAY, R.M., RODNIGHT, R., MURPHY, M.P., BIRLEY, J.L. Factors affecting the urinary excretion of endogenously formed dimethyltryptamine in normal human subjects. **Psychopharmacology**, v. 54, 1977.

OPITZ, C. A. et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. **Nature**, v. 478, n. 7368, p. 197-203, Oct 2011. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000295782800040 >.

OTT, J. Ayahuasca Analogues: Pangæan Entheogens. **Natural Products Books Co**, p. 127, 1994.

RIBA, J. et al. Subjective effects and tolerability of the South American psychoactive beverage Ayahuasca in healthy volunteers. **Psychopharmacology**, v. 154, n. 1, p. 85-95, Feb 2001. ISSN 0033-3158. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000167350400012 >.

RIBA, J. et. al. Human pharmacology of ayahuasca: Subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion, and pharmacokinetics. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 1, p. 73-83, Jul 2003. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000183613200010 >.

SCHWARCZ, R. et al. Modulation and function of kynurenic acid in the immature rat brain. **Tryptophan, Serotonin and Melatonin: Basic Aspects and Applications**, v. 467, p. 113-123, 1999. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000086779600017 >.

SILVA, S. et al. Oxidation of melatonin and its catabolites, N1-acetyl-N2 -formyl-5-methoxykynuramine and N1-acetyl-5-methoxykynuramine, by activated leukocytes. **J Pineal Res**, v. 37, n. 3, p. 171-5, Oct 2004. ISSN 0742-3098. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15357661 >.

SILVA, S.O. et al. Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of melatonin by activated neutrophils. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 279, n. 2, p. 657-62, Dec 2000. ISSN 0006-291X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11118341 >.

SILVA, S.O. et al. Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release. **J Neuroimmunol**, v. 156, n. 1-2, p. 146-52, Nov 2004. ISSN 0165-5728. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15465605 >.

SILVA, S. O. et al. Melatonin and its kynurenin-like oxidation products affect the microbicidal activity of neutrophils. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 2, p. 420-425, Feb 2006. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000235790200015 >.

SITARAM, B. R. et al. STUDY OF METABOLISM OF PSYCHOTOMIMETIC INDOLEALKYLAMINES BY RAT-TISSUE EXTRACTS USING LIQUID-CHROMATOGRAPHY. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 9, p. 1503-1508, May 1987. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1987H554400015 >.

STONE, T. W.; DARLINGTON, L. G. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 8, p. 609-620, Aug 2002. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000178778400014 >.

SZALARDY, L. et al. Mitochondrial Disturbances, Tryptophan Metabolites and Neurodegeneration: Medicinal Chemistry Aspects. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 13, p. 1899-1920, May 2012. ISSN 0929-8673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000303012900001 >.

SZARA, S. Dimethyltryptamine: its metabolism in man; the relation to its psychotic effect to the serotonin metabolism. **Experientia**, 1956.

TAN, D. et al. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. **J Pineal Res**, v. 34, n. 4, p. 249-59, May 2003. ISSN 0742-3098. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12662346 >.

TAN, D. X. et al. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: A potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 11, p. 1177-1185, Dec 2000. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165598100016 >.

TANIMUKAI, H., R GINTHER, J SPAIDE, J R BUENO, AND H E HIMWICH. Detection of psychotomimetic N,N-dimethylated indoleamines in the urine of four schizophrenic patients. *Br J Psychiat*, 1970.

THOMPSON, M. A. et al. Human indolethylamine N-methyltransferase: cDNA cloning and expression, gene cloning, and chromosomal localization. *Genomics*, v. 61, n. 3, p. 285-297, Nov 1999. ISSN 0888-7543. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000083824400007 >.

THOMPSON, M. A.; WEINSHILBOUM, R. M. Rabbit lung indolethylamine N-methyltransferase - cDNA and gene cloning and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 51, p. 34502-34510, Dec 18 1998. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000077542200085 >.

TOURINO, M. **Estudo da ação inibitória da enzima indolamina 2,3-dioxigenase pelos compostos triptamina e N-N-dimetilriptamina**: Dissertação de mestrado: Universidade de São Paulo 2012.

XIMENES, V. F.; CAMPA, A.; CATALANI, L. H. The oxidation of indole derivatives catalyzed by horseradish peroxidase is highly chemiluminescent. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 387, n. 2, p. 173-179, Mar 2001. ISSN 0003-9861. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000167634100001 >.

XIMENES, V. F. et al. Superoxide-dependent oxidation of melatonin by myeloperoxidase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 46, p. 38160-38169, Nov 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000233239800008 >.

YRITIA, M. et al. Determination of N,N-dimethyltryptamine and beta-carboline alkaloids in human plasma following oral administration of Ayahuasca. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 779, n. 2, p. 271-281, Nov 2002. ISSN 1570-0232. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000178936700012 >.

7. Anexos

7.1. CURRICULO LATTES

Dados Pessoais

Nome Janine Baptista Coimbra
Filiação Roner Lugon Coimbra e Jane Cunha Baptista Coimbra
Nascimento 09/03/1988 - Vitória/ES - Brasil
Carteira de Identidade 2026819 SSP - ES - 01/08/2002
CPF 12411649754

Endereço residencial Rua Rio Trombetas, 10
Bairro de Fátima - Serra
29160-559, ES - Brasil
Telefone: 27 33370368

Endereço profissional

-
- Brasil

Endereço eletrônico

e-mail para contato : janine.coimbra@usp.br
e-mail alternativo : jnine.bc@gmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

- 2010** Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Triptamina e dimetilriptamina em melanomas: biossíntese, metabolização e atividades antitumorais.
Orientador: Ana Campa
- 2006 - 2010** Graduação em FARMÁCIA.
Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, EMESCAM, Vitoria, Brasil
Título: Polimorfismo no gene da adiponectina e o risco de diabetes tipo 2 em pacientes obesos
Orientador: Flavia Imbroisi Valle Errera

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2010 - Atual Vínculo: Mestranda , Enquadramento funcional: Mestranda,
Regime: Dedicação Exclusiva

Atividades

2010 - Atual Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
Participação em projetos:
Triptamina e dimetiltryptamina em melanomas: biossíntese, metabolização e atividades antitumorais.

2. Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória - H. SANTA CASA

Vínculo institucional

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

3. Farmácia Avenida - FARMÁCIA AVENIDA

Vínculo institucional

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

4. Centro de Atendimento Toxicológico do ES - TOXCEN

Vínculo institucional

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

5. Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória - EMESCAM

Vínculo institucional

2007 - 2008 Vínculo: Iniciação Científica , Enquadramento funcional: Bolsista , Carga horária: 20, Regime: Dedicação Exclusiva

Atividades

2007 - 2008 Projetos de pesquisa, Centro de Pesquisa
Participação em projetos:
Polimorfismo no gene da adiponectina e o risco de diabetes tipo 2 em pacientes obesos

Projetos

2010 - Atual Triptamina e dimetiltryptamina em melanomas: biossíntese, metabolização e atividades antitumorais.

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Integrantes: Janine Baptista Coimbra (Responsável); ; Ana Campa

Financiador(es):

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

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1);

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

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

Número de produções C,T & A: 1/

Áreas de atuação

1. Farmácia
2. Toxicologia
3. Genética

Idiomas

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

Prêmios e títulos

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

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

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

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

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

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

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

II Congresso de Ciências da Saúde. , 2008.

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

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

Congresso de Ciências da Saúde. , 2007.

Apresentação de Trabalho

1. COIMBRA, J. B., CLARA, R. O., CAMPA, A.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Eventos

Participação em eventos

1. **III Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas**, 2011. (Simpósio)
2. **Challenge for Integrating Molecular and System Biology**, 2011. (Outra)
3. **Segurança no manuseio, descarte e transporte de resíduos químicos**, 2011. (Seminário)
4. **IX Simpósio de Biossegurança e Descartes Laboratoriais**, 2010. (Simpósio)
5. **Seminário Técnico de Cromatografia**, 2010. (Seminário)
6. Apresentação Oral no(a) **II Simpósio Estadual de Farmácia**, 2009. (Simpósio)
Polimorfismo no gene da adiponectina e o risco de diabetes tipo 2 em pacientes obesos.
7. **III Congresso de Ciências da Saúde**, 2009. (Congresso)
8. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **I Simpósio de Genética e Biologia Molecular do Espírito Santo**, 2008. (Simpósio)
O polimorfismo 45T>G do gene da adiponectina não está associado à gravidade da obesidade.
9. Apresentação Oral no(a) **II Congresso de Ciências da Saúde**, 2008. (Congresso)
Polimorfismo no gene da adiponectina e o risco de diabetes tipo 2 em pacientes obesos.
10. **XV Curso de Intoxicações**, 2008. (Outra)
11. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **Congresso de Ciências da Saúde**, 2007. (Congresso)
Prevalência de Alterações da Glicemia em Pacientes com Obesidade.
12. **XXIX Encontro Nacional dos Estudantes de Farmácia**, 2006. (Encontro)
13. **Semana de Farmácia**, 2006. (Outra)

Totais de produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos.....	3
Apresentações de Trabalhos (Conferência ou palestra).....	1
Apresentações de Trabalhos (Congresso).....	2
Apresentações de Trabalhos (Simpósio).....	1
Apresentações de Trabalhos (Outra).....	1

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	3
Participações em eventos (seminário).....	2
Participações em eventos (simpósio).....	4
Participações em eventos (encontro).....	1
Participações em eventos (outra).....	3

Outras informações relevantes

Monitorias durante a graduação:

-Monitoria da disciplina de Matemática e Bioestatística, do curso de Farmácia, do segundo semestre de 2006 ao fim do primeiro semestre de 2007, com carga horária de 72 horas em cada semestre. Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM), Departamento de Ciências Exatas e Naturais, professor titular Luiz Otavio Buffon.

-Monitoria da disciplina de Princípios de Biotecnologia, do curso de Farmácia, no primeiro semestre de 2008, com carga horária de 72 horas. Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM), Departamento de Ciências Exatas e Naturais, professora titular Débora Dummer Meira.

Cursos de curta duração:

-Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM), 7 a 9 de novembro de 2007 com carga horária de 6 horas/aula, “Cuidados Farmacêuticos na Diabetes”.

-Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), 28 de março de 2008 com carga horária de 2 horas, “DNA Forense”.

- Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM), 5 a 7 de novembro de 2008 com carga horária de 6 horas/aula, “Manipulação Homeopática para Uso Veterinário e Odontológico”.

- Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM), 28 a 30 de outubro de 2009 com carga horária de 6 horas/aula, “Implementação Sistemática de Laboratórios de Toxicologia”.

Exposição:

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

Curso de inglês no exterior

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

7.2. FICHA DO ALUNO

9141 - 7344386/1 - Janine Baptista Coimbra

Email: janine.coimbra@usp.br

Data de Nascimento: 09/03/1988

Cédula de Identidade: RG - 2.026.819-ES - ES

Local de Nascimento: Estado do Espírito Santo

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Farmacêutico - Escola de Medicina da Santa Casa de Misericórdia de Vitória -
Espírito Santo - Brasil - 2010

Curso: Mestrado

Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas

Data de Matrícula: 14/07/2010

Início da Contagem de Prazo: 14/07/2010

Data Limite: 14/01/2013

Orientador: Prof(a). Dr(a). Ana Campa - 14/07/2010 até o presente.
E.Mail: anacampa@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 14/07/2010

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 29/08/2011

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 14/07/2010
Matrícula Regular em 27/02/2012

9141 - 7344386/1 - Janine Baptista Coimbra

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5802-2/4	Tópicos Avançados em Toxicologia I	17/08/2010	14/12/2010	30	2	80	A	N	Concluída
QFL5921-6/1	Conceitos Básicos de Espectroscopia (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	02/09/2010	16/12/2010	150	10	100	A	N	Concluída
FBC5803-1/3	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	11/04/2011	24/04/2011	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5728-3/2	Aprimoramento Didático	12/04/2011	09/05/2011	60	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5814-5/1	Toxicologia Aplicada aos Alimentos	25/04/2011	18/05/2011	75	0	0	-	N	Turma cancelada
FBC5752-2/3	Danos em Biomoléculas e o seu Papel no Monitoramento da Exposição a Agentes Tóxicos	27/05/2011	01/07/2011	45	3	100	A	N	Concluída
EDM5791-5/7	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	23/08/2011	14/11/2011	120	8	83,3	A	N	Concluída
FBA5728-3/3	Aprimoramento Didático	12/09/2011	09/10/2011	60	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
MCM5891-1/3	Estatística Instrumental (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	04/10/2011	31/10/2011	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5704-6/1	Controle Terapêutico	20/10/2011	23/11/2011	75	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5813-3/1	Aplicações de Cromatografia em Análises Toxicológicas (1)	27/02/2012	04/04/2012	60	0	0	-	S	Aguardando avaliação
FBC5748-3/3	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação (1)	24/04/2012	05/06/2012	60	0	0	-	S	Cursando

Observações: (1) Disciplina(s) cursada(s) voluntariamente pelo(a) candidato(a) após ter cumprido as exigências regulamentares.

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	10	25	29
Estágios:			
Total:	10	25	29

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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