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

Integração metabólica no microambiente tumoral: metabolismo energético *versus*
metabolismo do triptofano

Maysa Braga Barros Silva

Tese para obtenção do título de DOUTOR.

Orientadora: Profa. Tit. Ana Campa

São Paulo

2021

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

Integração metabólica no microambiente tumoral: metabolismo energético *versus*
metabolismo do triptofano

Maysa Braga Barros Silva

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Tese para obtenção do título de DOUTOR.

Orientadora: Profa. Tit. Ana Campa

São Paulo
2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S813i Silva, Maysa Braga Barros
Integração metabólica no microambiente tumoral:
metabolismo energético versus metabolismo do
triptofano / Maysa Braga Barros Silva. - São Paulo,
2021.
99 p.

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

1. Metabolismo. 2. Câncer. 3. Melanoma. 4.
Melanócito. 5. Triptofano. I. T. II. Campa, Ana,
orientador.

Maysa Braga Barros Silva

Integração metabólica no microambiente tumoral: metabolismo energético *versus*
metabolismo do triptofano

Comissão julgadora da
Tese para obtenção do título de Doutor

Profa. Tit. Ana Campa
Orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

São Paulo, 24 de março de 2021.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

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

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, por tornar essa vitória possível e por ser minha fonte de forças todos os dias. Agradeço a minha mãe e ao meu padrasto, por sempre me incentivarem a seguir em frente pelo caminho que escolhi e por não medirem esforços para me ajudar em tudo e também, ao meu namorado Felipe, com quem dividi fielmente as alegrias e as dificuldades e que sempre me apoiou em tudo. Não existem palavras capazes de expressar a minha gratidão a vocês.

Agradeço a minha orientadora, Ana Campa, pela dedicação, paciência, confiança, incentivo e amizade durante esses anos. Obrigada por ser essa orientadora incrível! Agradeço também a técnica Silene, por toda ajuda e por ser além de técnica, amiga e ouvinte, você foi essencial.

Obrigada às meninas do laboratório, por toda ajuda com os experimentos, pelas discussões científicas, pelas risadas, pelos conselhos e pelas cervejas nos dias estressantes. Marcela, Mary e Paloma, vocês são demais!

Agradeço a todos os colaboradores desse trabalho: Profa. Ana Paula de Melo Loureiro, por toda ajuda, desde a execução de experimentos, até a análise e discussão de resultados, você foi essencial e também ao aluno Everson; Profa. Silvy Stuchi, a técnica Silvia Romano e as alunas do lab de patologia, sempre presentes e bem-dispostas à ajudar; Prof. Ernani, Felipe e Fabi Massas; Dr. Gilson Murata, pela ajuda com os experimentos e pela amizade.

Obrigada a todos que estiveram envolvidos neste trabalho!

BRAGA, M; CAMPA, A. **Integração metabólica no microambiente tumoral: metabolismo energético versus metabolismo do triptofano.** 2021. 99f. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A reprogramação metabólica e a indução do catabolismo de aminoácidos são essenciais para a progressão e regulação imunológica no câncer. Dentre os aminoácidos, o triptofano (Trp), possui estreita relação com um dos principais mecanismos de imunoescape e progressão tumoral, através do aumento da produção de quinurenina (KYN) proveniente da metabolização do Trp catalisada pela enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO). Apesar da importância do metabolismo do Trp e do metabolismo energético no câncer, até então, não existiam estudos que se dedicassem à integração dessas vias. Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar a regulação cruzada entre essas vias. Para isso utilizamos culturas de células normais (melanócitos) e uma linhagem tumoral (melanoma A375). Após adição de KYN e metabólitos da via KYN nos melanomas houve aumento da concentração do oncometabólito 2-hidroxiglutarato (2-HG) e de succinato e fumarato, que quando em excesso, também são considerados oncometabólitos. Glutamato, substrato anaplerótico preferido dos tumores, e aspartato, usado para a biossíntese de nucleotídeos, também tiveram concentrações aumentadas. Além disso, KYN aumentou as taxas de consumo de oxigênio, a acidificação do meio e a proliferação celular. Os efeitos de KYN e seus metabólitos sobre o metabolismo se estendem às células do microambiente, pois há uma intensificação da via glicolítica com produção de lactato nos melanócitos. Essas alterações metabólicas indicam que a formação de metabólitos da via KYN no microambiente tumoral causam mudanças metabólicas que potencializam o fenótipo tumoral trazendo vantagens para o tumor. Enquanto que, metabólitos da via serotoninérgica, especialmente serotonina (SER), apresentaram efeitos opostos. Aqui neste estudo, expandimos o conhecimento de como o metabolismo do Trp está intimamente ligado com a progressão do câncer, e acrescenta a ideia promissora de desviar a metabolização do Trp para outras vias competitivas à via KYN como estratégia para tratamento de neoplasias.

Palavras-Chaves: Metabolismo, câncer, melanoma, melanócito e triptofano.

Abstract

BRAGA, M; CAMPA, A. **Metabolic integration in the tumor microenvironment: energy metabolism versus tryptophan metabolism.** 2021. 99p. Thesis (doctorate) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo.

Metabolic reprogramming and induction of amino acid catabolism are essential for the progression and immune regulation in cancer. Among the amino acids, tryptophan (Trp), has a narrow relation with one of the main mechanisms of immune escape and tumor progression, by increasing kynurenine (KYN) production from the metabolism of Trp catalyzed by the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). Despite the importance of Trp metabolism and energy metabolism in cancer, until then, there were no studies dedicated to the integration of these pathways. Thus, the objective of this work was to investigate the crosstalking between these pathways. For this, we used cultures of normal cells (melanocytes) and a tumor line (melanoma A375). After KYN and KYN metabolites addition in melanomas, there was an increase in the concentration of the oncometabolite 2-hydroxyglutarate (2-HG) and succinate and fumarate, that when in excess, they are also considered oncometabolites. Glutamate, the preferred anaplerotic substrate for tumors, and aspartate, used for nucleotide biosynthesis, also had increased concentrations. In addition, KYN increased rates of oxygen consumption, acidification of the medium and cell proliferation. The effects of KYN and its metabolites on metabolism extend to the cells of the microenvironment, because there is an intensification of the glycolytic pathway with lactate production in the melanocytes. These metabolic changes indicate that the formation of KYN metabolites in the tumor microenvironment cause metabolic changes that potentiate the tumor phenotype bringing advantages to the tumor. Whereas, metabolites of the serotonergic pathway, especially serotonin (SER), had opposite effects. Here in this study, we expanded the knowledge of how Trp's metabolism is closely linked to cancer progression, and adds the promising idea of divert the metabolism of Trp to other competitive pathways via the KYN pathway as a strategy for the treatment of neoplasms.

Keywords: Metabolism, cancer, melanoma, melanocyte and tryptophan.

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	14
Lista de Figuras.....	17
Lista de Tabelas.....	19
1. Introdução.....	20
1.1. Metabolismo da célula tumoral.....	20
1.2. Metabolismo do Trp no câncer.....	24
2. Objetivo.....	29
2.1. Objetivos específicos.....	29
3. Materiais e Métodos.....	30
3.1. Condições de cultura celular.....	30
3.1.2. Tratamento das células.....	31
3.1.3. Contagem de células.....	31
3.2. Viabilidade celular por citometria de fluxo.....	31
3.3. Análise do consumo de glicose.....	31
3.4. Atividade de cadeia respiratória mitocondrial através do ensaio de MTT.....	31
3.5. Análise da via glicolítica e ciclo de Krebs.....	32
3.6. Atividade máxima de enzimas metabólicas.....	33
3.7. Determinação da concentração de lactato.....	34
3.8. Determinação de proteínas.....	34
3.9. Análise mitocondrial por <i>Seahorse (cell mito stress test assay)</i>	34
3.10. Ensaio de formação de colônias em Soft Ágar.....	35
3.11. Análise do metabolismo do Trp.....	35
3.12. Análise Estatística.....	36
4. Resultados e Discussão.....	37
4.1. Capítulo I.....	37
4.1.1. Resultados.....	37
4.1.2. Discussão.....	46
4.1.2.1. KYN potencializa alterações metabólicas que estão associadas à produção de oncometabólitos e progressão tumoral.....	47
4.1.2.2. Os produtos subsequentes da via KYN têm efeitos semelhantes aos de KYN no metabolismo energético e alguns outros efeitos pontuais.....	48

4.1.2.3. Metabólitos das vias SER e TRY também afetam o metabolismo energético.....	49
4.1.2.4. Efeitos isolados da serotonina no metabolismo energético.....	50
4.1.2.5. Efeitos opostos de KYN e SER nas mitocôndrias.....	50
4.2. Capítulo II.....	52
4.2.1. Resultados.....	52
4.2.2. Discussão.....	61
4.2.2.1. Metabólitos da via KYN modificam o metabolismo de melanócitos.....	61
4.2.2.2. Efeitos opostos de SER no metabolismo de melanócitos.....	62
5. Conclusão.....	64
6. Referências Bibliográficas.....	65
7. Material suplementar.....	80
8. Anexos.....	90

Lista de Abreviaturas

α -KG: alfa-cetoglutarato

2-HG: 2-hidroxiglutarato

5-HT: receptor de serotonina

AA: ácido antranílico

ADP: adenosina difosfato

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

AhR: receptor aril hidrocarboneto

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

AMP: adenosina monofosfato

ASL: argininosuccinato liase

ASS: argininosuccinato sintetase

ATP: adenosina trifosfato

CEP-HU-USP: comitê de ética em pesquisa do hospital universitário da USP

CO₂: dióxido de carbono

CS: citrato sintase

DMT: dimetiltriptamina

DMSO: dimetilsulfóxido

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

F6P: frutose-6-fosfato

FH: fumarase

GLUD: glutamato desidrogenase

GSL: glutaminase

G6PDH: glicose-6-fosfato desidrogenase

HAA: ácido 3-hidróxi-antranílico

HCL: ácido clorídrico

HIAA: ácido 5-hidróxi-indol-acético

HIF 1 α : fator induzido por hipóxia

HK: hexoquinase

IDH: isocitrato desidrogenase

IAA: ácido indolacético

IDO: indolamina 2,3-dioxigenase

IFN-gama: interferon gama

KA: ácido quinurênico

KCL: cloreto de potássio

KH₂PO₄: Fosfato monopotássico

KYN: quinurenina

LAT1: transportador de aminoácidos neutros tipo 1

LDH: lactato desidrogenase

MgCL₂: cloreto de magnésio

MLT: melatonina

MRM: monitoramento de múltiplas reações

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

NA: ácido nicotínico

NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido hidreto

NADP: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NAM: nicotinamida

PA: ácido pinolínico

PDH: piruvato desidrogenase

PFK1: fosfofrutoquinase 1

PK: piruvato quinase

PBS: tampão fosfato

PI: iodeto de propídio

QA: ácido quinolínico

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

SDH: succinato desidrogenase

SER: serotonina

SFB: soro fetal bovino

TCLE: consentimento livre e esclarecido

TDO: triptofano 2,3-dioxigenase

Trp: triptofano

TRY: triptamina

UV: radiação ultravioleta

Via KYN: via das quinureninas

Via SER: via serotoninérgica

Via TRY: via das triptaminas/ via das aminas traço

XA: ácido xanturênico

Lista de Figuras

Figura 1: Teorias do metabolismo energético das células tumorais.....	21
Figura 2: As três vias de metabolização do Trp.....	25
Figura 3: Concentração intracelular dos intermediários do metabolismo energético em células A375.....	40
Figura 4: Atividade de G6PDH, HK, PFK, PK, CS e LDH medida em células A375.....	41
Figura 5: Consumo basal de oxigênio (OCR) e acidificação extracelular (ECAR) mensurados em células A375.....	42
Figura 6: Proliferação Celular.....	43
Figura 7: Viabilidade Celular em células A375.....	44
Figura 8: Concentração dos metabólitos extracelulares do Trp (via KYN).....	44
Figura 9: Concentração dos metabólitos extracelulares do Trp (via SER).....	45
Figura 10: Concentração dos metabólitos extracelulares do Trp (via TRY).....	46
Figura 11: Efeitos de KYN e SER no metabolismo de células de melanoma A375.....	51
Figura 12: Concentração intracelular dos intermediários do metabolismo energético em melanócitos primários.....	55
Figura 13: Dosagem de lactato no sobrenadante e intracelular.....	56
Figura 14: Atividade de G6PDH, HK, PFK, PK, CS e LDH medida em melanócitos.....	57
Figura 15: Consumo basal de oxigênio (OCR) e acidificação extracelular (ECAR) mensurados em melanócitos primários.....	57
Figura 16: Número de células.....	58
Figura 17: Viabilidade Celular em melanócitos.....	59
Figura 18: Concentração dos metabólitos extracelulares do Trp (via KYN).....	59
Figura 19: Concentração dos metabólitos extracelulares do Trp (via SER).....	60
Figura 20: Concentração dos metabólitos extracelulares do Trp (via TRY).....	60
Figura 21: Efeitos de KYN e SER no metabolismo de melanócitos.....	63
Figura 22: (Suplementar) Efeito de KYN sobre o metabolismo de melanócitos e melanomas.....	81
Figura 23: (Suplementar) Efeito de AA sobre o metabolismo de melanócitos e melanomas.....	82
Figura 24: (Suplementar) Efeito de KA sobre o metabolismo de melanócitos e melanomas.....	83
Figura 25: (Suplementar) Efeito de XA sobre o metabolismo de melanócitos e melanomas.....	84

Figura 26: (Suplementar) Efeito de QA sobre o metabolismo de melanócitos e melanomas.....	85
Figura 27: (Suplementar) Efeito de NA sobre o metabolismo de melanócitos e melanomas.....	86
Figura 28: (Suplementar) Efeito de SER sobre o metabolismo de melanócitos e melanomas.....	87
Figura 29: (Suplementar) Efeito de MLT sobre o metabolismo de melanócitos e melanomas.....	88
Figura 30: (Suplementar) Efeito de TRY sobre o metabolismo de melanócitos e melanomas.....	89

Lista de Tabelas

Tabela 1: Viabilidade Celular, consumo de glicose e ensaio de MTT em células A375.....	37
Tabela 2: Concentração intracelular dos intermediários do metabolismo energético em células A375.....	39
Tabela 3: Viabilidade Celular, consumo de glicose e ensaio de MTT em melanócitos primários.....	53
Tabela 4: Concentração intracelular dos intermediários do metabolismo energético em melanócitos primários.....	54

1. Introdução

Estudos sobre a integração de vias metabólicas são fundamentais para entender a complexa regulação do metabolismo. Alguns exemplos de integração metabólica são clássicos, como a gliconeogênese e a glicólise, que são reguladas reciprocamente, enquanto uma via é minimamente ativa, a outra está altamente ativada. Outro exemplo, o AMP inibe e o citrato ativa a frutose 1,6-bisfosfatase, uma enzima essencial na gliconeogênese, enquanto essas moléculas têm efeitos opostos sobre a fosfofrutoquinase, o marcapasso da glicólise. No ciclo de Krebs, também podem ser vistas integrações metabólicas. Esse ciclo pode ter um papel anabólico, fornecendo intermediários para a biossíntese em outras vias, como succinil-CoA para a formação de porfirinas e citrato para a formação de ácidos graxos. Além disso, uma reação reversível que ocorre no citosol é a transaminação entre alanina e piruvato, e não só a alanina, mas vários aminoácidos podem ser convertidos em piruvato. Assim, a transaminação é uma importante ligação entre o metabolismo de aminoácidos e carboidratos (STRYER, 2002).

Nas células tumorais ocorrem várias mudanças metabólicas. Apesar de não existir uma “assinatura metabólica” única para o câncer, algumas modificações são mais frequentes. Um exemplo clássico é o metabolismo da glutamina para anaplerose do ciclo de Krebs. Assim, a integração de vias metabólicas na saúde e na doença são fundamentais para entender o funcionamento das células isoladamente e no microambiente (HEIDEN *et al.*, 2017).

1.1. Metabolismo da célula tumoral

As células tumorais necessitam de um grande suprimento de ATP para manter o seu metabolismo e realizar a síntese de biomoléculas (KIM, 2018). Existem algumas teorias que tentam explicar o metabolismo energético do câncer. A primeira teoria, o famoso efeito *Warburg*, mostrou que as células tumorais possuem um metabolismo energético no qual as mitocôndrias são menos efetivas na produção de ATP e há um aumento da produção de lactato, mostrando que elas dependem principalmente da via glicolítica para a produção de ATP (Figura 1A). Como essa repressão do metabolismo oxidativo acontece mesmo na presença de oxigênio, esse fenômeno metabólico é conhecido como glicólise aeróbica, ou então como efeito *Warburg* (WARBURG, 1956).

Figura 1: Teorias do metabolismo energético das células tumorais. (A) Metabolismo de uma célula normal na presença de oxigênio e teoria do efeito *Warburg* em células tumorais. (B) Teoria da simbiose metabólica e glutaminólise em células tumorais (KIM *et al.*, 2018).

Desde a descoberta do efeito *Warburg*, diversos estudos vêm sendo feitos para descobrir os mecanismos moleculares que podem desencadear o *switch* metabólico fosforilação oxidativa ↔ glicólise aeróbica. Um dos principais determinantes para o efeito de *Warburg* é a superexpressão de transportadores de glicose (PALSSON-MCDERMOTT *et al.*, 2013). Além disso, foi proposto que em células tumorais o piruvato não pode ser eficientemente metabolizado pelas mitocôndrias desviando assim o fluxo metabólico para a produção de lactato. Três eventos explicariam isso: a) a restrição do transporte do piruvato na matriz mitocondrial, b) a inibição da atividade do complexo piruvato desidrogenase (PDH), e c) a superativação da lactato desidrogenase (DIAZ-RUIZ *et al.*, 2011).

Existem muitos estudos mostrando que as células tumorais sofrem reprogramação metabólica e utilizam principalmente a glicólise aeróbica como fonte de energia, em vez de fosforilação oxidativa, mesmo na presença de oxigênio (WARBURG, 1956). Até a pouco tempo, era amplamente aceito que a glicose é a principal fonte de ATP dos tumores, no entanto, isso só acontece quando a glicose é a única fonte de nutrientes sob hipóxia (KIM *et al.*, 2018) e estudos mais recentes mostraram que algumas células tumorais apresentam aumento da fosforilação oxidativa (DAR *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2018).

A segunda teoria sobre o metabolismo do câncer mostrou que as células tumorais regulam mutuamente seu metabolismo energético por meio de simbiose metabólica: uma célula tumoral produz lactato com produção de ATP ao consumir glicose (efeito Warburg) e uma célula vizinha consome o lactato secretado para produzir ATP através do ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa (Figura 1B) (SONVEAUX *et al.*, 2008; FAUBERT *et al.*, 2017). Algumas células tumorais usam o lactato como substrato para intermediários do ciclo de Krebs e para a produção de ATP (FAUBERT *et al.*, 2017). Além disso, o lactato pode ser convertido em piruvato pela ação da lactato desidrogenase (LDH) e posteriormente em acetil-CoA pela ação da ATP-citrato liase para a síntese de ácidos graxos (Figura 1B) (ZAIDI *et al.*, 2012), contribuindo para a biossíntese de moléculas importantes para proliferação das células tumorais.

Esses novos estudos desafiaram o efeito *Warburg*, uma vez que *Warburg* afirmou que danos nas mitocôndrias de células tumorais poderiam explicar a fermentação e acidificação do meio (WARBURG, 1956), porém, estudos recentes já mostraram que as mitocôndrias de células tumorais possuem função ativa de fosforilação oxidativa (KIM *et al.*, 2018). Sendo assim, as células tumorais exibem heterogeneidade no uso da fosforilação oxidativa ou glicólise como fonte de energia e essa flexibilidade indica uma adaptação para sobrevivência. (DAR *et al.*, 2017).

A importância da reprogramação metabólica na célula tumoral tem sido muito evidenciada nos últimos anos e foi adicionada como um dos *hallmarks* do câncer em 2011 (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011). Também recentemente, tem ficado claro que há mudanças metabólicas ao longo da progressão. Por exemplo, tumores *in situ* tem metabolismo diferente de metástases (MORANDI *et al.*, 2014). As mudanças metabólicas também se estendem as células estromais e células do sistema imune (LEONE e POWELL, 2020).

A via glicolítica e ciclo de Krebs ocupam uma posição central no metabolismo e atendem a maior demanda energética das células (DESIDERI *et al.*, 2015), e as células tumorais possuem a capacidade de gerar macromoléculas a partir de nutrientes extracelulares disponíveis, isso é feito através de vias metabólicas, que permitem um desvio significativo de fontes de nutrientes para a biomassa intracelular (YANG *et al.*, 2017).

Além do metabolismo energético, sabe-se que a indução do catabolismo de aminoácidos é essencial para a progressão e regulação imunológica no câncer (CANTOR

e SABATINI, 2012), e também possui características específicas em células tumorais, como: aumento da demanda de nitrogênio para reações biosintéticas, consumo elevado de aminoácidos, dependência de fontes exógenas para aminoácidos não essenciais e concentrações alteradas de enzimas que catalisam a síntese de aminoácidos (LUKEY *et al.*, 2016; PEARCE *et al.*, 2013). Além disso, os aminoácidos atuam como fonte de energia, estão envolvidos no equilíbrio redox, e na regulação epigenética e imunológica ligada à tumorigênese e metástase (LIEU *et al.*, 2020).

A terceira teoria do metabolismo do câncer envolve o metabolismo do aminoácido glutamina, isso porque, depois da glicose, o nutriente que é mais rapidamente consumido por células tumorais é a glutamina (ALTMAN *et al.*, 2016), substrato anaplerótico preferido dessas células (DEBERARDINIS *et al.*, 2007). As altas concentrações de glutamina são importantes para as células tumorais, pois esse aminoácido é fonte de carbono e nitrogênio que sustenta a biossíntese e o crescimento do tumor (ALTMAN *et al.*, 2017). Após a entrada nas células, a glutamina é convertida pelas glutaminases mitocondriais (GSL) em um íon amônio e glutamato. O glutamato então pode ser convertido em α -cetoglutarato, através da enzima glutamato desidrogenase (GLUD) ou por aminotransferases, e então o α -cetoglutarato entra no ciclo de Krebs (ALTMAN *et al.*, 2017), processo conhecido como glutaminólise (YANG *et al.*, 2017). A partir da glutaminólise, a glutamina é utilizada para repor os intermediários do ciclo de krebs e também para síntese de ácidos graxos, que são considerados precursores biossintéticos (Figura 1B) (DEBERARDINIS *et al.*, 2007, 2008). A ativação do oncogene MYC, por exemplo, induz a glutaminólise em células tumorais (WALLACE, 2012).

Além disso, foi mostrado um novo caminho para o α -cetoglutarato proveniente da glutamina, a carboxilação redutora, onde o α -cetoglutarato derivado da glutamina é reduzido através do consumo de NADPH pelas isocitrato desidrogenases, formando citrato, que suporta a síntese de acetil-CoA. Esse processo pode ser uma fonte de carbono para a síntese lipídica em células tumorais hipóxicas (GAMEIRO *et al.*, 2013).

Assim como a glutamina, a asparagina também fornece substratos para as células tumorais, pois gera aspartato e em seguida oxaloacetato, substrato anaplerótico do ciclo de Krebs (ZHANG *et al.*, 2014). O ciclo da uréia também está ligado com o metabolismo energético, a arginina é um metabólito intermediário do ciclo da uréia cuja biossíntese de novo requer duas etapas enzimáticas sequenciais: argininosuccinato sintetase (ASS) que catalisa a síntese de argininosuccinato a partir de citrulina e argininosuccinato liase (ASL)

que converte argininosuccinato em arginina e fumarato, metabólito do ciclo de Krebs (KUO *et al.*, 2010).

Algumas mutações ou diminuições da expressão de enzima, também levam ao acúmulo de algumas moléculas. No caso a diminuição da expressão da ASS, leva ao acúmulo de aspartato, permitindo que esse aminoácido seja utilizado para a biossíntese de nucleotídeos apoiando a proliferação tumoral (SULLIVAN *et al.*, 2016). Outro exemplo dessas alterações tumorais, são as mutações das enzimas isocitrato desidrogenase 1 e 2 (IDH 1/2), que ao invés da enzima oxidar o isocitrato para α -cetoglutarato, passa a reduzir o α -cetoglutarato ao oncometabólito 2-hidroxioglutarato (2-HG) (DAN *et al.*, 2018).

Além desses aminoácidos, as células tumorais podem consumir do meio outros aminoácidos como a serina (MATTAINI *et al.*, 2016), a glicina, que é necessária para a biossíntese de nucleotídeos (MADDOCKS *et al.*, 2013). E também já foi mostrado que as células tumorais esgotam rapidamente a arginina e o triptofano disponíveis no ambiente celular (PEARCE *et al.*, 2013).

O aminoácido triptofano (Trp) e seu metabolismo possui estreita relação com um dos principais mecanismos de imunoescape e progressão tumoral e está relacionado ao aumento da expressão de indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), enzima que catalisa a transformação de Trp em quinurenina (KYN) (KIM *et al.*, 2007; MUNN *et al.*, 2007). O aumento da expressão de IDO e produção de KYN é observado em muitos tumores e está associado a papéis imunossupressores, principalmente por meio da regulação da anergia de células T efectoras e indução da proliferação de células T reguladoras, levando ao escape imune do tumor (WU *et al.*, 2018). O aumento da expressão de IDO e aumento da razão KYN/Trp plasmáticos tem sido associada a um mau prognóstico e a metástases em muitos cânceres, como por exemplo, em melanomas (WEINLICH *et al.*, 2007; INO *et al.*, 2008; SPEECKAERT *et al.*, 2012).

1.2. Metabolismo do Trp no câncer

Um dos exemplos mais antigos da ligação entre o aumento do catabolismo de aminoácidos e câncer é o catabolismo de triptofano (Trp) (LEPPANEN e OKA, 1963), um aminoácido essencial, substrato para a síntese proteica, que pode ser catabolizado por três vias metabólicas distintas. A principal delas é a via das quinureninas (via KYN), que quando conduzida pelas enzimas IDO e/ou triptofano-2,3-dioxigenase (TDO) forma quinurenina (KYN) e a partir de KYN, uma gama de produtos secundários são gerados,

por exemplo, ácido antranílico (AA), ácido quinurênico (KA), ácido xanturênico (XA), ácido quinolínico (QA) e ácido nicotínico (NA).

Outra via de metabolização do Trp é a via serotoninérgica (via SER), a qual é responsável pela produção de serotonina (SER) e melatonina (MLT), dentre outros metabólitos. Uma pequena parte deste aminoácido ainda poder ser convertida em dimetiltriptamina (DMT) conduzindo o catabolismo por uma terceira via, a via das triptaminas (via TRY). As vias de metabolização do Trp estão apresentadas na figura 2.

Figura 2: As três vias de metabolização do Trp: via KYN (esquerda), via SER (meio) e via TRY (direita).

Os transportadores de aminoácidos são essenciais para o crescimento e proliferação de células normais e transformadas (MCGIVAN *et al.*, 1994). LAT1 é um dos transportadores de aminoácidos do tipo L e transporta grandes aminoácidos neutros, como o triptofano (YANAGIDA *et al.*, 2001). Já foi mostrado que LAT1 é altamente expresso em diversos tipos de tumores (YANAGIDA *et al.*, 2001), e que essa expressão possui relação direta com a proliferação celular, angiogênese e regulação do ciclo celular (OHKAME *et al.*, 2001), além disso, melanomas expressam mais LAT1 do que melanócitos (SHIMIZU *et al.*, 2015).

Células que expressam IDO, como células do sistema imune e células tumorais, possuem captação modificada de triptofano através de um novo sistema de transporte que possui propriedades funcionais diferentes das do LAT1 (SILK *et al.*, 2011), além disso, IFN- γ não só induz a enzima IDO, mas também é capaz de induzir um sistema de

transporte seletivo de triptofano (BHUTIA *et al.*, 2014). Os compostos das vias de metabolização do Trp possuem papéis conhecidos no microambiente tumoral. A seguir serão apresentadas as características desses metabólitos nos processos tumorais e na resposta imunológica.

Como comentado anteriormente, os metabólitos da via KYN fazem parte de um dos principais mecanismos de tolerância, imunoescape e progressão tumoral, através do consumo e depleção de Trp e expressão da enzima IDO (BADAWY, 2018; KIM *et al.*, 2007; MUNN e MELLOR, 2007). IFN- γ é o principal indutor de IDO (BHUTIA *et al.*, 2015) e pode ser produzido por diferentes células imunológicas no microambiente tumoral (GAJEWSKI, SCHREIBER e FU, 2013). Além disso, KYN também é produzida pela ação da enzima TDO e mais recentemente alguns estudos apontam para seu papel na progressão tumoral (PILOTTE *et al.*, 2012). A inibição das enzimas IDO e TDO tem sido considerada uma estratégia para a restauração da imunidade (BADAWY, 2018). De fato, 18 estudos clínicos com diferentes inibidores de IDO estão sendo realizados (em acesso ao website *clinicaltrials.gov* em 13.01.2021).

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

O ácido antranílico (AA) e o 3-hidroxi-antranílico (HAA) estão envolvidos com a etiologia do câncer de bexiga (TEULINGS *et al.*, 1973) e ambos metabólitos podem auto-oxidar e gerar espécies reativas de oxigênio que podem interagir com o mesmo receptor da KYN, o AhR (CHUNG *et al.*, 2011). Os metabólitos finais da via KYN também possuem atividade pró-tumoral. PA é capaz de diminuir a proliferação de linfócitos e de células NK, alterando a produção de quimiocinas e o recrutamento de leucócitos (FRUMENTO *et al.*, 2002; BOSCO *et al.*, 2003). Acredita-se também que a atividade de IDO aumente a síntese de QA, ácido nicotínico (NA) e nicotinamida (NAM) e mantenha os níveis de NAD⁺ altos, fator crucial para a proliferação celular incessante, o que ocorre com as células tumorais proliferativas (CHIARUGI *et al.*, 2012).

Não só a via KYN, a via SER também tem sido apontada como moduladora no microambiente tumoral. Efeitos tanto pró como antitumorais tem sido descritos para a SER. A SER estimula o crescimento do tumor através dos seus receptores 5-HT1 e 5-HT2 (ZAMINPIRA *et al.*, 2017), por exemplo, o aumento da via SER está relacionado à progressão maligna em câncer de mama humano (JUHASZ *et al.*, 2012) e pacientes com síndrome carcinoide apresentam altas concentrações de SER e seu precursor 5-hidroxitriptofano (SHAH *et al.*, 2005). Em contraste, doses baixas de serotonina podem inibir o crescimento do tumor (ZAMINPIRA *et al.*, 2017). Já a MLT é uma molécula com atividade antitumoral proposta. A MLT inibe o crescimento de células tumorais através da sua atividade antioxidante, por estimulação de apoptose e por inibição da angiogênese, metástase e alterações epigenéticas (Li *et al.*, 2017).

A MLT tem capacidade de capturar radicais de oxigênio e gerar diferentes metabólitos. O principal metabólito da MLT é o *N*1-acetil-*N*2-formil-5-metóxiquinuramina (AFMK). E então, o AFMK obtido por oxidação da MLT pode ser deformilado por uma formidase e dar origem a *N*1-acetil- α 5-metoxiquinuramina (AMK) (HIRATA *et al.*, 1974). O nosso grupo já demonstrou que AFMK e AMK mantêm as atividades biológicas reconhecidas para a MLT e SER sobre células do sistema imune, particularmente na inibição da produção de citocinas e da proliferação celular, muitas vezes em intensidades superiores à própria MLT, sugerindo que a metabolização da MLT à AFMK em sítios inflamatórios teria um forte papel imunomodulatório (SILVA *et al.*, 2004).

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

Como mencionado acima, apesar da importância da reprogramação metabólica e do metabolismo de Trp para os processos de proliferação tumoral e imunoativação, poucos estudos exploram o papel do metabolismo desse aminoácido no metabolismo do tumor. Os estudos existentes sobre os metabólitos do Trp estão relacionados aos seus efeitos no sistema nervoso central, especialmente nas condições cognitivas e psiquiátricas

(SCHWARCZ e STONE, 2017). Por exemplo, o ácido quinurênico (KA) é aumentado no cérebro de pessoas com esquizofrenia (KINDLER *et al.*, 2019) e os pacientes com depressão apresentam diminuição do nível de KA e KYN (OGYU *et al.*, 2018). Além disso, a diminuição da atividade das vias SER desempenha papel importante na fisiopatologia da depressão (COWEN e BROWNING, 2015).

Além disso, não existem estudos que se dediquem à integração do metabolismo do Trp e do metabolismo energético. O único estudo que integra essas duas vias metabólicas, mostrou, *in vitro*, que o ácido xanturênico (XA) era capaz de inibir a atividade da enzima aconitase (MURAKAMI *et al.*, 2006). Sendo assim, aqui, abordamos se o Trp e alguns dos metabólitos representativos das três vias de metabolização do Trp modificam o metabolismo energético das células tumorais e não tumorais. Além disso, dada a importância da metabolização do Trp no escape imunológico de tumores, também abordamos o efeito de alguns dos intermediários da via da glicólise e do ciclo do TCA na metabolização do Trp. A identificação de moléculas capazes de integrar essas vias pode auxiliar na compreensão sobre os sinais envolvidos no desenvolvimento e na progressão de tumores. Além disso, as diferenças metabólicas entre células normais e células tumorais são importantes para o entendimento do metabolismo tumoral.

2. Objetivo

Esse trabalho teve como objetivo investigar a interação do metabolismo de triptofano e do metabolismo energético, e ainda o efeito dos principais metabólitos do Trp sobre a proliferação e atividade mitocondrial em células tumorais e em células normais.

2.1. Objetivos específicos

Na linhagem de melanoma humano A375 e em melanócitos primários tratados com os principais metabólitos do Trp (KYN, AA, KA, XA, NA, QA, SER, MLT e TRY) foi realizado:

- Padronização das concentrações e tempo de exposição aos tratamentos não citotóxicos através de ensaio de viabilidade por citometria de fluxo;
- Avaliação do consumo de glicose;
- Avaliação da atividade mitocondrial através do ensaio de MTT;
- Avaliação do metabolismo tumoral (metabólitos da via glicolítica, ciclo de Krebs, fosforilação oxidativa e aminoácidos) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas;
- Avaliação da atividade de enzimas que participam da via glicolítica e o ciclo de Krebs;
- Avaliação do consumo de oxigênio e acidificação do meio de cultura através do Seahorse (*cell mito stress test assay*);
- Avaliação do crescimento celular independente de ancoragem através do ensaio de formação de colônias em Soft-Agar;
- Avaliação da proliferação celular através da contagem de células.

Na linhagem de melanoma humano A375 e em melanócitos primários tratados com lactato, piruvato, succinato e fumarato foi realizado:

- Padronização das concentrações e tempo de exposição aos tratamentos não citotóxicos através de ensaio de viabilidade por citometria de fluxo;
- Avaliação o metabolismo de Trp (produtos das três vias catabólicas) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Condições de cultura celular

Os experimentos foram realizados com uma linhagem de melanoma humano metastático (A375), que faz parte da biblioteca de células da Profa. Silvy SM Engler. Essa linhagem é correntemente utilizada pelo grupo e já mostrou fazer *switch* metabólico fosforilação oxidativa ↔ glicólise aeróbica (KUDRYAVTSEVA *et al.*, 2016; GUO *et al.*, 2016).

As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI (*Roswell Park Memorial Institute médium*) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), além de penicilina (50 U/mL) e estreptomicina (50 µg/mL) e ao atingirem 2 ou 3 passagens foram plaqueadas e usadas nos experimentos.

Para verificarmos se os metabólitos do Trp são capazes de induzir uma alteração metabólica em células normais, também utilizamos uma célula não transformada, com baixa taxa de proliferação, que foram melanócitos primários. Os melanócitos foram isolados de prepúcio de doadores submetidos à cirurgia de postectomia, frente à concessão livre e esclarecida destes. O procedimento cirúrgico foi realizado no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP) sob responsabilidade de L. Maximiano (Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-HU-USP número 943/09). O isolamento das células da pele a partir de prepúcio foi realizado em colaboração com o Laboratório de Citologia Clínica coordenado pela Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler. Todos os doadores assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), já utilizado pelo grupo de pesquisa da Profa. Silvy Stuchi. Esclarecemos que o presente estudo foi enviado ao Hospital Universitário para que seja alocado como adendo-participante das questões éticas do Comitê já aprovado para as pesquisas do grupo da Profa. Dra. Silvy Stuchi.

Os prepúcios foram lavados, esterilizados e as camadas da pele foram separadas por incubação com dispase (Roche). A epiderme foi desmembrada da derme para o isolamento de queratinócitos e melanócitos com uso de tripsina. A derme foi digerida com collagenase tipo I para isolamento dos fibroblastos. Por fim os melanócitos foram cultivados em meio 254CF e suplementados com kit de crescimento para melanócitos SKU (ambos da *Cascade Biologics*). Essas células foram utilizadas nos experimentos com as passagens entre 4 e 5.

3.1.2. Tratamento das células

Para as análises de via glicolítica e ciclo de Krebs, utilizamos alguns dos principais metabólitos do Trp (KYN, AA, KA, XA, NA, QA, SER) na concentração de 100 μ M e (MLT e TRY) na concentração de 50 μ M.

Para a análise do metabolismo do Trp, utilizamos lactato, piruvato, succinato e fumarato na concentração de 2,5 mM.

Todas as análises foram feitas 24 horas após os tratamentos (foi sinalizado quando outro tempo foi utilizado).

3.1.3. Contagem de células

As células (1×10^5) foram plaqueadas em seus respectivos meios de cultura e foram tratadas com as concentrações citadas acima desses metabólitos. Após 24, 48 e 72 horas as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS e foi feita a contagem celular utilizando o corante azul de trypan em câmara de Neubauer.

3.2. Viabilidade celular por citometria de fluxo

Afim de definir concentrações não citotóxicas de metabólitos do Trp, lactato, piruvato, succinato e fumarato, foram plaqueadas 1×10^5 células em seus respectivos meios de cultura e foram tratadas com as concentrações citadas acima desses metabólitos. Após 24 horas as células foram lavadas 2 vezes com PBS e em seguida tripsinizadas e incubadas com anexina V (invitrogen) conjugada com APC e com Iodeto de Propídio (PI). A viabilidade das células foi analisada por citometria de fluxo (FACS Calibur; Becton-Dickinson), onde foi medido apoptose e necrose. A porcentagem de células em processo de necrose e apoptose foi analisada utilizando o software FlowJo.

3.3. Análise do consumo de glicose

A taxa de consumo de glicose das células foi verificada através do uso do kit Glicose Liquiform® (Labtest, Brasil). O ensaio se baseia no sistema enzimático glicose oxidase/peroxidase com posterior leitura espectrofotométrica ($\lambda = 540$ nm).

3.4. Atividade de cadeia respiratória mitocondrial através do ensaio de MTT

O sal tetrazólico MTT é reduzido a formazam pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial, que está ativa em células com a cadeia respiratória intacta. A quantidade de formazam produzido é proporcional a atividade da mitocôndria, sendo

quantificado por leitura espectrofotométrica. Para isso, as células foram plaqueadas e tratadas com as concentrações não citotóxicas de metabólitos do Trp e após 24 horas foram lavadas 2 vezes com PBS e foram incubadas com uma solução de 5mg/ml de MTT durante 3 horas permitindo a formação do formazan (precipitado), em seguida foi dissolvido em DMSO e foi feita a leitura. A absorbância foi lida em 570 nm.

3.5. Análise da via glicolítica e ciclo de Krebs

As células (1×10^5) foram tratadas com os metabólitos do Trp e após 24 horas, o meio de cultura foi removido e a camada celular foi cuidadosamente lavada com PBS. Em seguida, as células foram ressuspensas em 100 μ L do tampão de ressuspensão (acetonitrila : acetato de amônio 5 mM - 9:1 pH 8,5). Ácido benzoico (0.01 μ g/ μ L) e benzamida (0.001 μ g/ μ L) foram adicionados como padrão interno e então as amostras foram armazenadas no freezer – 80°C por 24 horas. Em seguida, foi adicionado 385 μ L da solução de extração (40 % acetonitrila, 40% metanol e 20% água) e 15 μ L do padrão interno ($[^{13}\text{C}_{10}^{15}\text{N}_5]$ ATP, 500 pmol). As placas foram centrifugadas a 20.000 g, alíquotas de 450 μ L foram transferidas para microtubos e as amostras foram armazenadas a -20°C. Na hora da análise, as amostras foram secas a vácuo, ressuspensas em 30 μ L de água grau HPLC e centrifugadas por 5 minutos a 16.000 g. Dessa solução, 6 μ L foram injetados em cromatografia líquida de alta performance acoplado ao sistema de espectrometria de massa em tandem e ionização por electrospray (HPLC-ESI-MS/MS).

Para malato, citrato, piruvato, lactato, aspartato, argininosuccinato, asparagina, arginina, fumarato, succinato, 2-L-hidroxiglutarato, glutamina e glutamato, o ácido benzoico foi utilizado como padrão interno. Para AMP, ADP e ATP, $[^{13}\text{C}_{10}^{15}\text{N}_5]$ ATP foi usado como padrão interno. Para esses metabólitos foi utilizado o modo negativo de ionização por electrospray (ESI^- , $[\text{M}-\text{H}]^-$). Para nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP^+), nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), adenosina, nicotinamida e nicotinamida mononucleotídeo, a benzamida foi utilizada como padrão interno no modo positivo de ionização (ESI^+ , $[\text{M}+\text{H}]^+$).

Curvas padrões foram preparadas e usadas para encontrar condições cromatográficas otimizadas: coluna Luna Omega PS C18 (150 x 2.1 mm i.d., 5.0 μ m, 100A Phenomenex) com uma pré coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluídas em gradiente contendo uma solução com 0,1% de ácido fórmico em água (Solução A) e 40% de acetonitrila em tampão de acetato de amônio 10 mM (Solução B). As análises

foram realizadas a partir do software *Analyst* e os dados foram coletados a partir do modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*).

3.6. Atividade máxima de enzimas metabólicas

As células tratadas foram homogeneizadas em tampão de extração (pH 7,4) contendo: 50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, coquetel de inibidor de proteases e Triton X-100 1%. A atividade máxima das enzimas hexoquinase (HK), Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), fosfofrutoquinase 1 (PFK1), piruvato quinase (PK), citrato sintase (CS) e lactato desidrogenase (LDH) foram determinadas a 25°C utilizando espectrofotômetro *SpectraMax Plus*.

A atividade máxima da HK (EC 2.7.1.1) foi determinada utilizando o tampão de ensaio composto por 75mM Tris-HCl, 7,5mM MgCl₂, 0,8mM EDTA, 1,5mM KCl, 4mM β-mercaptoetanol, 0,05% Triton X 100, 0,4mM NADP⁺, 2,5mM ATP, 1,4 U glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e o homogeneizado. A reação foi iniciada com a adição de 1mM de glicose e as absorbâncias foram lidas em placas UV a 340nm (CRABTREE *et al.*, 1972).

A atividade máxima de G6PDH (EC 1.1.1.49) foi determinada utilizando o tampão de ensaio constituído de 86mM de cloridrato de trietanolamina, 6,9mM MgCl₂, 0,4mM NADP⁺, 1,2mM glicose-6-fosfato, 0,05% Triton X-100 e 1,2 unidades de fosfogluconato desidrogenase e o homogeneizado. A reação foi iniciada com a adição de glicose-6-fosfato e as absorbâncias foram lidas em placas UV a 340nm.

A atividade máxima da PFK1 (EC 2.7.1.56) foi determinada numa reação que constituiu de 50mM Tris-HCl, 2mM MgSO₄, 5mM KCl, 0,05% Triton x 100, 2U LDH, 4U PK, 1mM ATP, 0,2mM NADH, 2mM PEP e o homogeneizado. A reação foi iniciada com adição de 3mM de frutose-6-fosfato (F6P) e também foi avaliada em placa UV a 340nm (HENGARTNER; HARRIS, 1975).

A atividade de PK (EC 2.7.1.40), foi feita numa reação que constituiu 100mM KH₂PO₄, 10mM MgCl₂, 80mM KCl, 0,05% Triton x 100, 9 U LDH, 0,17mM NADH e 5mM ADP. A adição do homogeneizado e de 2mM de PEP iniciou a reação. As leituras das absorbâncias foram realizadas a 340nm em placa UV de 96 poços (ZAMMIT *et al.*, 1978).

A atividade máxima da CS (EC 4.1.3.7) foi determinada em tampão de ensaio (pH 8,1) constituído de 100mM de Tris-HCl, 1mM EDTA, 0,2mM ácido ditio-nitrobenzóico (DTNB), 0,1mM acetil-CoA, Triton X-100 0,05% (v/v) e o homogeneizado. A reação

foi iniciada com a adição de 1mM de oxaloacetato e as absorbâncias lidas a 412 nm (ALP *et al*, 1976).

A atividade da LDH (EC 1.1.1.27), foi determinada utilizando kit comercial específico (LDH liquiform, Labtest, Belo Horizonte, MG, BR, código 86).

Os resultados das atividades enzimáticas, exceto LDH, foram expressos como $\mu\text{mol}/\text{min}$ por miligrama de proteína. O resultado da atividade da LDH foi expresso em unidade (U) por miligrama de proteína.

3.7. Determinação da concentração de lactato

A determinação de lactato foi feita no sobrenadante e também no *pellet* de células seguindo as instruções do fabricante (Lactato enzimático, Labtest, Belo Horizonte, MG, BR, código 138). As absorbâncias foram lidas utilizando placa de 96 poços em espectrofotômetro *SpectraMax Plus* a 340 nm. Os valores foram expressos como miligrama de lactato por miligrama de proteína.

3.8. Determinação de proteínas

A determinação da concentração de proteínas em cada amostra foi realizada utilizando o método de Bradford (1976) com o monitoramento da absorbância do complexo formado em 595 nm. A concentração foi determinada pela comparação com uma curva padrão de albumina de soro bovino.

3.9. Análise mitocondrial por Seahorse (*cell mito stress test assay*)

Após 24h de tratamento com KYN, SER e AA, o sobrenadante das células (1×10^4) foi removido e as células foram lavadas 2 vezes com 500 μL do meio de ensaio pré-aquecido (RPMI sem bicarbonato de sódio e soro fetal bovino - pH 7,4 para os melanomas e meio 254CF para os melanócitos) e então, 400 μL do meio de ensaio foi adicionado. As células foram incubadas por 1 hora numa estufa sem CO_2 a 37°C por 1 hora. Os estímulos pré-aquecidos (oligomicina, FCCP e rotenona + antimicina A) foram carregadas nas portas A, B e C no cartucho do injetor respectivamente. As concentrações finais das injeções foram: 1 μM de oligomicina, 0,5 μM de FCCP e 2,5 μM de rotenona + antimicina A. O cartucho foi calibrado pelo analisador XF24 (Seahorse Bioscience, Billerica, MA, EUA). A taxa de consumo de oxigênio (OCR) e a taxa de acidificação extracelular (ECAR) foram detectadas em condições basais, seguidas pela adição sequencial de oligomicina, FCCP, bem como rotenona + antimicina A. Essas adições permitiram a

dosagem do vazamento de prótons, respiração máxima, capacidade respiratória de reserva, respiração não mitocondrial e produção de ATP.

3.10. Ensaio de formação de colônias em Soft Ágar

O meio RPMI e a agarose a 1,2% de baixo ponto de fusão foram cuidadosamente misturados e colocados no fundo de placas de 6 poços, e então, as placas foram mantidas em temperatura ambiente para solidificação. Em seguida, as células 2×10^4 (cél/poço), tratadas previamente com KYN, AA e SER foram misturadas numa solução contendo 0,7% de agarose e transferidas para os poços das placas já revestidos com agarose. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por 15 minutos para solidificação. Então, as placas foram incubadas numa estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C por 10 dias. Por fim, as colônias foram contadas e fotografadas usando um microscópio, e em seguida, as colônias foram coradas com o marcador fluorescente 4', 6'-diamino-2-phenylindole (DAPI) por 18 horas e a leitura foi feita em espectrofotômetro (Biotek-Synergy HT) a λ exc 363 e 448.

3.11. Análise do metabolismo do Trp

As células (1×10^5) foram tratadas com lactato, fumarato e succinato e após 24 horas, 500 μ L do sobrenadante foi retirado para análise dos metabólitos do Trp. Para isso, o sobrenadante foi incubado com 1000 μ L da solução de extração (metanol:acetona 1:1 + 0,1% de ácido acético) e com 10 μ L da solução mix de padrão interno (MLT-D4 e Trp-D5), e então, as amostras foram homogeneizadas com vórtex por um minuto e incubadas por 30 minutos a -20°C para a precipitação de proteínas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000g por 10 minutos a 4°C e 1.300 μ L sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi seco a vácuo. Após a secagem, as amostras foram ressuspensas em 100 μ L da solução de ressuspensão (água:metanol 1:1) e 5 μ L de amostra foi injetado num fluxo de 200 μ L/min no LC-MS/MS (LC 1250 Bin Pump VL e 1260 HiP ALS acoplado a um espectrofotômetro de massa do tipo triplo quadrupolo 6460 ((Agilent Technologies, CA, USA)). A linearidade foi verificada por análise de regressão e a fonte de íons de electrospray foi operada no modo positive (ESI⁺, [M+H]⁺). As análises foram realizadas a partir do software *MassHunter Quantitative Analysis* (Agilent Technologies) e os dados foram coletados a partir do modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). Foi utilizado uma coluna Luna C18 (150 mm x 2 mm, 3 μ m) de fase reversa

para a separação. A cromatografia foi realizada através de um gradiente de eluição composto por água, 0,5% de ácido fórmico e 2 mM de formiato de amônio numa mistura de acetonitrila : água (9:1) (ajustado com 0,5% de ácido fórmico).

3.12. Análise Estatística

O software utilizado para a análise estatística foi o GraphPad Prism 5. Os testes utilizados foram ANOVA One e Two Way com pós-teste de Tukey e, quando necessário, foi aplicado o Teste T.

4. Resultados e Discussão

Os resultados e discussões apresentados nessa tese foram divididos em dois capítulos, a seguir, apresentamos o capítulo I.

4.1. Capítulo I: Integração do metabolismo do Trp e do metabolismo energético em melanomas

4.1.1. Resultados

Para verificar possíveis interações entre o metabolismo do Trp e o metabolismo energético, adicionamos metabólitos do Trp na linhagem de melanoma humano metastático A375. Os metabólitos KYN, AA, KA, XA, NA, QA e SER na concentração de 100 μ M e MLT e TRY na concentração de 50 μ M não foram tóxicos as células pois não levaram a morte celular após análise por citometria de fluxo em 24 horas (Tabela 1). O consumo de glicose do meio de cultura foi medido pelo kit Glucose Liquiform® após 24 horas. As células de melanoma consumiram mais de 100 mg/dL e os metabólitos do Trp não alteraram o consumo de glicose, com exceção da serotonina, que diminuiu o consumo de glicose cerca de 20% (Tabela 1). E, no ensaio de MTT, usado para analisar a atividade mitocondrial, a produção de formazan foi menor quando tratamos as células com KA e SER (Tabela 1).

	Viabilidade Celular (%)	Consumo de Glicose (mg/dL)	Redução do MTT (%)
A375	91.59 $\pm$ 2.39	113.67 $\pm$ 4.11	98.33 $\pm$ 1.25
+KYN	91.90 $\pm$ 0.53	118.67 $\pm$ 2.62	98.44 $\pm$ 2.21
+AA	87.83 $\pm$ 2.08	112.67 $\pm$ 5.91	95.73 $\pm$ 1.56
+KA	92.50 $\pm$ 0.44	109.00 $\pm$ 0.47	81.47 $\pm$ 2.22 ***
+XA	90.97 $\pm$ 1.76	115.00 $\pm$ 0.94	99.76 $\pm$ 1.37
+QA	91.23 $\pm$ 1.95	116.00 $\pm$ 3.40	96.67 $\pm$ 2.19
+NA	91.27 $\pm$ 0.65	109.67 $\pm$ 4.64	95.74 $\pm$ 1.93
+SER	92.20 $\pm$ 0.61	91.00 $\pm$ 1.89 ***	84.17 $\pm$ 1.53 ***
+MLT	92.37 $\pm$ 0.29	123.00 $\pm$ 1.70	96.31 $\pm$ 3.20
+TRY	92.77 $\pm$ 1.02	112.33 $\pm$ 2.16	91.67 $\pm$ 2.51

Tabela 1: Viabilidade Celular por citometria de fluxo, consumo de glicose e ensaio de MTT em células A375 (1×10^5 células/poço) após 24 horas na presença de KYN, AA, KA, XA, QA, NA, SER (100 μ M) e MLT e TRY (50 μ M). Os dados representam média $\pm$ desvio padrão. n=3. *** p <0.001 comparado ao controle.

A tabela 2 mostra os efeitos de KYN, AA, KA, XA, QA, NA, SER, MLT e TRY após 24 horas nos produtos finais da glicólise, intermediários do ciclo de Krebs, alguns aminoácidos e moléculas de alta energia no metabolismo, como NADH, ADP e ATP, medido por espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida (HPLC-MS / MS). Os gráficos completos desses resultados encontram-se no material suplementar dessa tese.

μM	A375	+KYN	+AA	+KA	+XA	+QA	+NA	+SER	+MLT	+TRY
Lactato	34.89 ± 1.55	33.13 ± 4.97	25.59 ± 4.35 *	31.41 ± 1.33	30.14 ± 3.85	29.01 ± 4.99	29.39 ± 2.88 *	20.09 ± 0.73 ***	33.00 ± 3.44	33.07 ± 6.14
Piruvato	0.55 ± 0.07	0.52 ± 0.12	0.58 ± 0.04	0.66 ± 0.05	0.54 ± 0.02	0.58 ± 0.09	0.64 ± 0.08	0.46 ± 0.05	0.51 ± 0.04	0.49 ± 0.02
Citrato	23.69 ± 1.54	20.56 ± 1.88	17.87 ± 0.90 **	16.85 ± 3.38 *	19.40 ± 0.37 **	21.63 ± 1.04	18.79 ± 2.81 *	15.75 ± 1.33 **	16.45 ± 1.34 **	16.75 ± 1.53 *
Succinato	5.52 ± 0.28	7.83 ± 0.54 *	9.12 ± 0.96 *	9.64 ± 3.31	6.52 ± 1.41	7.63 ± 0.29 *	6.30 ± 1.88	0.95 ± 0.52 **	4.21 ± 1.57	3.09 ± 2.12
Fumarato	2.88 ± 0.19	4.09 ± 0.40 *	4.62 ± 0.45 **	4.27 ± 0.25 **	3.88 ± 0.45 *	3.12 ± 0.31	3.53 ± 1.21	1.01 ± 0.27 **	3.30 ± 0.12 *	2.42 ± 0.52
Malato	35.22 ± 2.73	50.90 ± 7.85 *	61.55 ± 0.62 ***	71.65 ± 3.40 ***	49.46 ± 7.57 *	49.49 ± 2.22 **	45.38 ± 4.96 *	22.00 ± 1.92 ***	42.39 ± 8.40	33.67 ± 6.22
2-HG	10.70 ± 0.40	18.64 ± 1.35 **	20.22 ± 3.58 *	18.82 ± 2.00 **	11.92 ± 1.13	14.49 ± 2.53	12.47 ± 0.69 *	5.95 ± 0.73 **	11.64 ± 0.06	6.95 ± 1.58 *
A. Succinato	0.21 ± 0.01	0.27 ± 0.15	0.32 ± 0.06 *	0.32 ± 0.08	0.26 ± 0.05	0.23 ± 0.06	0.28 ± 0.12	1.39 ± 0.30 **	0.20 ± 0.04	0.15 ± 0.04
Arginina	45.02 ± 5.20	47.40 ± 4.44	43.72 ± 5.36	51.28 ± 13.78	36.72 ± 1.43	101.10 ± 2.40 ***	65.50 ± 47.18	192.30 ± 31.13 ***	52.83 ± 18.84	101.77 ± 27.58 *
Glutamina	1.35 ± 0.18	1.78 ± 0.39	2.06 ± 0.74	2.95 ± 1.49	2.24 ± 0.66	1.71 ± 0.77	2.27 ± 1.18	2.43 ± 0.51 *	2.65 ± 0.83	0.95 ± 0.26
Glutamato	63.78 ± 10.35	117.76 ± 3.72 ***	139.83 ± 24.40 **	150.18 ± 82.42	113.79 ± 8.92 **	157.06 ± 27.68 *	148.52 ± 16.67 **	104.51 ± 4.43 *	112.03 ± 26.75	65.12 ± 9.56
Aspartato	4.38 ± 0.83	9.52 ± 0.53 **	7.03 ± 1.40	13.93 ± 8.86	13.60 ± 0.66 ***	15.32 ± 2.05 **	11.71 ± 0.34 **	8.31 ± 0.60 *	6.26 ± 2.41	2.70 ± 1.21
Asparagina	1.61 ± 0.16	2.70 ± 0.85	6.84 ± 1.60 **	3.67 ± 0.57 **	4.45 ± 2.21	2.42 ± 0.49	2.86 ± 0.56 *	1.39 ± 0.30	2.77 ± 0.24 **	3.39 ± 0.92 *
NAD	73.18 ± 5.02	68.36 ± 5.41	70.29 ± 9.53	66.67 ± 4.99	67.60 ± 2.95	71.05 ± 3.97	68.16 ± 3.92	58.84 ± 8.09	79.82 ± 13.23	72.67 ± 3.49
NADH	1.49 ± 0.05	0.78 ± 0.03 **	1.46 ± 0.35	1.61 ± 0.53	1.43 ± 0.54	1.81 ± 0.78	1.10 ± 0.21	1.09 ± 0.31	3.15 ± 2.97	3.55 ± 0.69 **
NADP	7.62 ± 0.44	6.91 ± 1.01	4.82 ± 0.93 **	4.59 ± 0.86 **	5.67 ± 0.30 **	5.03 ± 0.73 **	4.61 ± 0.37 **	3.07 ± 0.68 **	4.24 ± 0.40 **	4.02 ± 0.10 **
Adenosina	24.52 ± 1.77	24.40 ± 4.46	34.55 ± 6.07	25.77 ± 3.94	18.33 ± 3.61	35.16 ± 4.44 *	30.17 ± 6.42	17.64 ± 0.78	28.15 ± 1.05	14.63 ± 1.60 **
NMN	0.95 ± 0.16	0.86 ± 0.22	0.80 ± 0.04	0.80 ± 0.17	0.66 ± 0.15	0.97 ± 0.13	0.94 ± 0.17	0.65 ± 0.09 *	1.13 ± 0.17	1.04 ± 0.14
AMP	1.90 ± 0.19	2.72 ± 0.25 **	6.62 ± 1.50 **	4.10 ± 1.06 *	2.14 ± 0.19	5.59 ± 1.66 *	6.52 ± 0.92 **	3.16 ± 0.88 **	9.59 ± 1.47 ***	6.58 ± 0.50 ***
ADP	16.65 ± 0.69	20.72 ± 1.29 **	29.29 ± 2.04 ***	26.93 ± 0.32 ***	17.58 ± 0.52	30.15 ± 1.40 ***	32.85 ± 2.40 ***	19.36 ± 0.52 *	33.58 ± 5.26 **	31.03 ± 1.37 ***
ATP	84.86 ± 5.69	81.02 ± 1.35	77.29 ± 3.80	82.85 ± 4.61	85.00 ± 1.43	87.65 ± 4.07	89.59 ± 2.66	72.15 ± 4.62	87.11 ± 5.05	86.97 ± 7.63
NAD/NADH	71.65 ± 21.91	70.23 ± 23.83	48.93 ± 5.33	44.45 ± 14.37	54.06 ± 27.02	44.53 ± 18.62	62.97 ± 8.74 *	56.43 ± 13.93	42.20 ± 35.65	21.06 ± 4.66 *
ADP/ATP	0.20 ± 0.02	0.26 ± 0.01 *	0.31 ± 0.14	0.33 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.27 ± 0.12	0.37 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.39 ± 0.08 *	0.36 ± 0.02 ***

Tabela 2: Concentração intracelular dos intermediários do metabolismo energético em células A375 dosados por LCMS. (1x10⁵ células/poço) tratadas com KYN, AA, KA, XA, NA, QA e SER (100μM) e MLT e TRY (50μM) por 24 horas. Os dados

representam média $\pm$ desvio padrão. (n= 2-3) *** p <0.001, ** p <0.01 e * p <0.05 comparado ao controle. Os resultados estatisticamente significativos estão em negrito.

De maneira geral, a presença dos metabólitos do Trp levou a modificações no metabolismo energético que se encaixa em dois perfis mais prevalentes. Um desses perfis é desencadeado por KYN e seus produtos subsequentes, especialmente AA, enquanto o outro é composto por metabólitos da via serotoninérgica. A figura 3 mostra os dados da Tabela 2 para KYN, AA e SER e mostra mais claramente esses dois perfis. A adição de KYN nos melanomas A375 levou ao aumento da concentração dos metabólitos do ciclo de Krebs (succinato, fumarato e malato), e também aumentou glutamato, aspartato e o oncometabólito 2-HG, além disso, a adição de KYN aumentou a razão ADP/ATP e diminuiu NADH. Os resultados para AA foram semelhantes a KYN. Os efeitos observados após a adição de SER foram diferentes. SER levou a diminuição de lactato, citrato, succinato, fumarato, malato, 2-HG e aumentou argininosuccinato, arginina, glutamina, glutamato, aspartato, ADP e AMP, além de diminuir a concentração de NAD, adenosina e NMN (figura 3).

Figura 3: Concentração intracelular dos intermediários do metabolismo energético em células A375 dosados por LCMS. (1×10^5 células/poço) tratadas com KYN, AA e SER (100 μ M) por 24 horas. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão. (n= 2-3). ***

$p < 0.001$, ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$ comparado ao controle. As barras brancas representam os controles e as barras pretas representam as condições tratadas com KYN, AA e SER.

Todos os experimentos a seguir foram realizados com esses três metabólitos: KYN, AA e SER. A atividade de algumas das principais enzimas que definem o curso da via metabólica, que são G6PDH, HK, PFK, PK, CS e LDH, não apresentou alterações significativas, exceto por um efeito moderado de AA sobre a atividade da enzima citrato sintase, responsável por catalisar a primeira reação do ciclo de Krebs (Figura 4).

Figura 4: Atividade de G6PDH, HK, PFK, PK, CS e LDH medida em células A375 (1×10^6 células/poço) tratadas com KYN, AA e SER (100 μ M) por 24 horas. Os dados foram normalizados por miligrama de proteína e representam média $\pm$ desvio padrão. $n=6$. * $p < 0.05$ comparado ao controle.

O Seahorse Bioanalyzer (cell mito stress test) foi usado para medir as taxas de consumo basal de oxigênio (OCR) e acidificação extracelular (ECAR). No melanoma A375, a adição de KYN e SER causou efeitos opostos no OCR e no ECAR. KYN aumentou, AA não interferiu e SER diminuiu esses parâmetros. A administração sequencial de inibidores do complexo da cadeia de transporte de elétrons (ETC) durante este experimento permite a avaliação em tempo real de diferentes parâmetros associados à respiração mitocondrial. A oligomicina (inibidor do complexo V) determina a quantidade de produção de ATP conectada à respiração e o vazamento de prótons, o FCCP (carbonil cianeto-4- (trifluorometoxi) fenil-hidrazona, desacoplador mitocondrial) permite a medição da capacidade respiratória máxima, enquanto uma combinação de rotenona (inibidor do complexo I) e antimicina A (inibidor do complexo III) determinam

a capacidade respiratória reservada e o consumo de oxigênio não mitocondrial. KYN causou um aumento na maioria desses parâmetros, AA não se alterou e SER, por outro lado, diminuiu a respiração máxima e a capacidade de reserva respiratória (Figura 5).

Figura 5: Consumo basal de oxigênio (OCR) e acidificação extracelular (ECAR) mensurados em células A375 através do Seahorse (*cell mito stress test assay*). (1×10^4 células/poço) tratadas com KYN, AA e SER (100 μ M) por 24 horas. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão. $n=3$. * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$ comparado ao controle.**

O efeito de KYN, AA e SER na proliferação celular foi medido em um ensaio de crescimento celular independente de ancoragem. Esse ensaio mede a capacidade das células tumorais de crescerem independentemente de uma superfície sólida, e é considerado um *hallmark* do câncer (FENG *et al.*, 2017). Por meio desse ensaio, observamos que KYN e AA aumentaram a capacidade do A375 de formar colônias mesmo em meio semissólido e que SER diminuiu essa capacidade (Figura 6A-B). O mesmo foi observado para a contagem de células, KYN e AA aumentaram a proliferação

após todos os tempos testados, enquanto a SER diminuiu a proliferação em 48 e 72 horas (Figura 6C).

Figura 6: Análise da proliferação celular. (A-B) Crescimento celular independente de ancoragem através do ensaio de formação de colônias em Soft-Agar (2×10^4 células/poço) após 10 dias de tratamento e (C) Número de células através de contagem com Azul de Trypan (1×10^5 células/poço) após 24, 48 e 72 horas do tratamento medidos em células de melanoma A375 tratadas com KYN, AA e SER (100 μM). Os dados representam média $\pm$ desvio padrão. $n=5$. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$ comparado ao controle; ### $p < 0.001$ comparado a KYN.

Por fim, testamos o efeito de alguns metabólitos do metabolismo energético, como lactato, piruvato, fumarato e succinato, sobre o consumo basal de Trp e produção de seus principais metabólitos. As concentrações utilizadas não foram tóxicas para as células (Figura 7) e diferentemente das alterações significativas produzidas pelos metabólitos do Trp sobre intermediários da glicólise e intermediários do ciclo do TCA, praticamente nenhuma alteração foi causada pelo fumarato, lactato, piruvato e succinato na

concentração dos metabólitos do Trp: KYN, AA, KA, XA, QA, NA, MLT, HIAA, TRY e IAA, exceto por pequenas modificações causadas por piruvato e succinato no consumo de Trp (respectivamente 25 e 10%) (Figura 8) e por lactato no consumo de SER (10%) (Figura 9).

Figura 7: Viabilidade Celular por citometria de fluxo em células A375. (1×10^5 células/poço) após 24 horas na presença de lactato, piruvato, succinato e fumarato (2,5 mM). Os dados representam média $\pm$ desvio padrão. n=3.

Figura 8: Concentração dos metabólitos extracelulares do Trp (via KYN) dosados por LCMS em células A375 (1×10^5 células/poço) tratadas com fumarato lactato, piruvato e succinato (2,5 mM) por 24 horas. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão. $n=3$. * $p < 0.001$ e * $p < 0.05$ comparado ao controle. As linhas vermelhas no gráfico representam a concentração do metabólito presente no meio de cultura.**

Figura 9: Concentração dos metabólitos extracelulares do Trp (via SER) em células A375 (1×10^5 células/poço) tratadas com fumarato lactato, piruvato e succinato (2,5 mM) por 24 horas. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão. $n=3$. * $p < 0.05$ comparado ao controle. As linhas vermelhas no gráfico representam a concentração do metabólito presente no meio de cultura.

Figura 10: Concentração dos metabólitos extracelulares do Trp (via TRY) dosados por LCMS em células A375 (1×10^5 células/poço) tratadas com fumarato lactato, piruvato e succinato (2,5 mM) por 24 horas. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão. $n=3$. As linhas vermelhas no gráfico representam a concentração do metabólito presente no meio de cultura.

4.1.2. Discussão

A reprogramação metabólica é considerada um *hallmark* do câncer, sendo uma maneira de fornecer moléculas para a produção de energia e sustentar a proliferação tumoral (COSTA e FREZZA, 2017) e por isso, o metabolismo tem sido alvo para novos tratamentos antitumorais (LUENGO *et al.*, 2017). Nesse capítulo, nosso principal objetivo, foi avaliar se o metabolismo energético de células tumorais é afetado por metabólitos produzidos pelas vias de metabolização do Trp.

Como já descrito anteriormente, o Trp é metabolizado por três vias diferentes. A principal é a via KYN, associada à imunomodulação e ao imuno escape tumoral (HORNYÁK *et al.*, 2018). A segunda rota, é a via SER, que produz principalmente SER e MLT, metabólitos que possuem muitos efeitos biológicos e por fim, a via das aminas traço (via TRY), que produz TRY e outras substâncias neuroativas (BADAWY, 2019). Ao analisarmos algumas possibilidades de como esses metabólitos podem afetar o

metabolismo energético, identificamos uma possível integração entre essas vias, que podem atualizar o papel do metabolismo de Trp na progressão do câncer.

4.1.2.1. KYN potencializa alterações metabólicas que estão associadas à produção de oncometabólitos e progressão tumoral

Ao tratarmos as células de melanoma com KYN, observamos que esse metabólito modifica a concentração da maioria dos compostos do ciclo de Krebs, por exemplo, observamos que KYN aumentou a concentração de succinato, fumarato, malato, 2HG, glutamato e aspartato, além disso, levou a diminuição de NADH e aumento de AMP e ADP.

O acúmulo de succinato e fumarato nos tumores se dá pela perda da atividade das enzimas succinato desidrogenase (SDH) e fumarase (FH), respectivamente (SULLIVAN *et al.*, 2016). O acúmulo desses metabólitos faz com que eles sejam considerados oncometabólitos, pois tanto o succinato como o fumarato são estruturalmente semelhante ao alfa-cetoglutarato (α -KG), e podem inibir competitivamente as dioxigenases dependentes de α -KG que estão envolvidas na regulação epigenética, e também estão envolvidos na ativação da sinalização hipóxica, (XIAO *et al.*, 2012), pois os tumores deficientes de SDH e FH mostram estabilização dos fatores induzidos por hipóxia (HIF) mesmo na presença de oxigênio (POLLARD *et al.*, 2005).

O 2-HG foi o primeiro composto descrito como oncometabólito (COLLINS *et al.*, 2017), e nós observamos que após adição de KYN, a concentração de 2-HG dobrou em células de melanoma. Os efeitos epigenéticos gerados por 2-HG podem promover a expressão de genes semelhantes a células-tronco e ativar a sinalização para o crescimento celular descontrolado (WANG *et al.*, 2013). O aumento de 2-HG está associado à proliferação tumoral, invasão, metástase, agressividade e resistência ao tratamento (PERSI *et al.*, 2018). No câncer, 2-HG é produzido por (i) enzimas mutadas IDH1 e IDH2 e, assim como succinato e fumarato, 2-HG é estruturalmente semelhante a α -KG e, portanto, inibe competitivamente enzimas dependentes de α -KG (SULLIVAN *et al.*, 2016); (ii) a acidificação no microambiente tumoral (INTLEKOFER *et al.*, 2017), ou (iii) a ativação de MYC, um dos genes mais comumente superexpressos em tumores humanos (TERUMUNA *et al.*, 2014).

Nós observamos o aumento da acidificação do meio de cultura dos melanomas após adição de KYN, o que pode explicar o aumento observado na concentração de 2-

HG. Além disso, as células de melanoma A375 expressam MYC (LIN *et al.*, 2017) e, recentemente, foi mostrado que MYC aumenta as concentrações intracelulares de Trp e seus metabólitos da via KYN, além de induzir a expressão dos transportadores de Trp (SLC7A5 e SLC1A5) no câncer colorretal (VENKATESWARAN *et al.*, 2019). MYC também está associado ao aumento da glutaminólise (SCHULZE e HARRIS, 2012), o que pode explicar o aumento da concentração de glutamato causado por KYN e seus metabólitos subsequentes.

A glutamina é o substrato anaplerótico preferido de células tumorais e estas utilizam o glutamato como substrato gerador de energia (DEBERARDINIS *et al.*, 2007), inclusive, a inibição do metabolismo da glutamina tem se mostrado um alvo farmacológico benéfico para o tratamento do câncer (ALTMAN *et al.*, 2016). O aumento da concentração de glutamato após a adição de KYN é um achado interessante, fato que pode potencializar o metabolismo das células tumorais, favorecendo a progressão tumoral. O mesmo raciocínio pode ser útil para o acúmulo de aspartato observado em melanomas após a adição de KYN. A concentração aumentada de aspartato é usada para a biossíntese de nucleotídeos, apoiando a proliferação celular (RABINOVICH *et al.*, 2015).

A presença de IDO, enzima que catalisa a etapa limitante da metabolização do Trp pela via KYN, em tumores e em células imunológicas do microambiente tumoral, é um marcador da maioria dos tipos de tumores (VENANCIO *et al.*, 2019). A presença de KYN no plasma está associada ao risco de câncer (CHUANG *et al.*, 2014) e também a malignidade (FERNS *et al.*, 2015). Os nossos dados identificaram uma integração bioquímica entre o metabolismo do Trp e o metabolismo energético nunca descrita anteriormente, e parece notável a importância da reprogramação metabólica e da produção de KYN para a progressão e agressividade do tumor. KYN afeta significativamente o metabolismo energético, exacerbando o fenótipo metabólico do tumor.

4.1.2.2. Os produtos subsequentes da via KYN têm efeitos semelhantes aos de KYN no metabolismo energético e alguns outros efeitos pontuais

De maneira geral, os metabólitos da via KYN tiveram efeitos semelhantes a própria KYN. Todos, ou quase todos, os metabólitos testados da via KYN levaram ao aumento de succinato, fumarato, malato, 2HG, glutamato, aspartato-asparagina, AMP e

ADP. E também, levaram à diminuição do citrato e do NADP. A diminuição da concentração de citrato também está associada ao fenótipo tumoral, devido ao uso de citrato e acetil-CoA para sintetizar lipídios necessários para a tumorigênese (MULLEN *et al.*, 2012).

Os metabólitos AA, KA e NA tiveram efeitos específicos e pontuais sobre o metabolismo energético, como por exemplo, o aumento da concentração de asparagina (Tabela 2). O aumento da asparagina também está associado ao fenótipo tumoral, pois esse metabólito é essencial para prevenir a apoptose de células tumorais e a expressão da enzima asparagina sintase, está clinicamente relacionada com a progressão e ao mal prognóstico de pacientes com câncer (ZHANG *et al.*, 2014). Além disso, QA aumentou a concentração de arginina e AA aumentou a concentração de argininosuccinato. A L-arginina é o único precursor do óxido nítrico (NO) associado à iniciação, promoção e progressão do tumor (RIZI *et al.*, 2017) e o aumento de argininosuccinato pode estar associado ao acúmulo de fumarato e efeitos no fluxo do ciclo da ureia (ADAM *et al.*, 2013).

Apesar de KYN ser o metabólito mais abundante, os outros metabólitos da via KYN já foram detectados em linhagens tumorais (CLARA *et al.*, 2015; BRAGA, 2017), culturas de células imunológicas (MORENO *et al.*, 2013) e em câncer colorretal e de mama (PUCCETTI *et al.*, 2015), câncer de pulmão (SUZUKI *et al.*, 2010) e glioblastoma (KESARWANI *et al.*, 2018; HENG *et al.*, 2016), sugerindo que eles fazem parte das moléculas ativas que compõem o microambiente tumoral.

4.1.2.3. Metabólitos das vias SER e TRY também afetam o metabolismo energético

A via SER, que produz principalmente SER, MLT e outros produtos derivados é altamente explorada pelos seus efeitos do sistema nervoso central (SNC), porém, alguns pesquisadores estão tentando elucidar o papel de SER e MLT na transformação celular e na malignidade (SARROUILHE *et al.*, 2015), no entanto, os efeitos desses metabólitos no câncer ainda não estão completamente definidos. A maioria dos estudos existentes apontam para um efeito antitumoral desses compostos (ZAMINPIRA *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017).

A via TRY, é uma via pouco estudada. Estudos anteriores do nosso grupo mostraram que as linhagens de melanoma podem produzir metabólitos dessa rota

(GOMES *et al.*, 2014), e esses metabólitos podem afetar o reconhecimento da célula tumoral pelas células do sistema imunológico (TOURINO *et al.*, 2013).

Nós testamos os efeitos de SER, MLT e TRY no metabolismo energético e após adição desses metabólitos aos melanomas observamos diminuição da concentração de citrato e NADPH e por outro lado, observamos aumento na concentração de aspartato-asparagina, arginina, AMP e ADP. Dentre os três metabólitos, SER causou um número mais significativo de alterações e, para a maioria dos analitos, as alterações foram no sentido oposto às causadas pelo KYN.

4.1.2.4. Efeitos isolados da serotonina no metabolismo energético

De maneira geral, os efeitos de KYN e outros metabólitos da via KYN no metabolismo celular, consumo de glicose, produção de lactato e função mitocondrial foram opostos aos efeitos de SER. Após a adição de SER, houve diminuição do consumo de glicose e do lactato extracelular, além de aumento de glutamato, glutamina, aspartato, arginosuccinato e arginina. A concentração do oncometabólito 2-HG também foi diminuída, assim como succinato, fumarato, malato e aumento da arginina, glutamina, glutamato, aspartato. Todas essas alterações se encaixam em um perfil de regressão no fenótipo do tumor.

Nós observamos um aumento de quatro vezes na concentração de arginina após adição de SER nos melanomas. Sabe-se que o óxido nítrico (NO), que possui a arginina como precursora, pode afetar o transporte de SER (GARTHWAITE, 2007), porém não existe dados que mostrem SER controlando o metabolismo de arginina. As células tumorais têm a capacidade de regular a disponibilidade intracelular de arginina para a síntese de NO, uma vez que o NO pode afetar o tumor por meio da supressão de vias oncogênicas ou da ativação de vias supressoras de tumor (KESHET e EREZ, 2018).

Embora exista estudos que mostrem um papel controverso de SER no câncer, esse metabólito pode inibir o crescimento do tumor devido ao seu efeito vasoconstritor (ZAMPIRA *et al.*, 2017). Além disso, SER parece estar envolvido na redução do tumor associado a alguns tratamentos antitumorais (VICAUT *et al.*, 2000).

4.1.2.5. Efeitos opostos de KYN e SER nas mitocôndrias

Alterações na dinâmica mitocondrial são essenciais na regulação do metabolismo em células tumorais (SERASINGHE *et al.*, 2015). Por exemplo, em melanomas com

mutação do tipo BRAFV600E, como é o caso da linhagem celular A375, a sinalização oncogênica aumenta o metabolismo dependente de glicose e diminui a produção de ATP mitocondrial. Por outro lado, quando essas células são inibidas farmacologicamente por terapia direcionadas, como PLX-4032/vemurafenibe, o metabolismo da glicose é reduzido e as células tumorais aumentam a produção de ATP mitocondrial para sustentar a sobrevivência e a progressão tumoral (TROTTA *et al.*, 2017).

A adição de KYN aos melanomas, causou um aumento nas taxas de consumo basal de oxigênio (OCR) e um aumento da acidificação do meio de cultura e da respiração não mitocondrial, alterações que favorecem a sobrevivência e resistência tumoral. Por outro lado, SER diminuiu a respiração máxima, reserva da capacidade respiratória e acidificação no meio de cultura, corroborando com a menor produção de lactato, evidenciando assim, prejuízo da atividade mitocondrial e da capacidade de uso da glicose.

A figura 11, mostra um resumo das alterações observadas no capítulo 1.

Figura 11: Efeitos de KYN e SER no metabolismo de células de melanoma A375. Os metabólitos em cinza são os que tiveram a concentração diminuída e os metabólitos em negrito são os que tiveram a concentração aumentada.

4.2. Capítulo II: Efeito dos metabólitos do Trp sobre o metabolismo energético em melanócitos

4.2.1. Resultados

Afim de verificar se o metabolismo de células normais também poderia ser alterado por metabólitos do Trp e por metabólitos da via glicolítica e do ciclo de Krebs, fizemos as mesmas análises utilizando melanócitos humanos primários. Os melanócitos responderam muito menos que os melanomas aos metabólitos e os efeitos quando presentes foram mais sutis. Mesmo assim chamam a atenção e não foram previamente descritos.

Sendo assim, para verificar possíveis interações entre o metabolismo do Trp e o metabolismo energético, adicionamos metabólitos do Trp nos melanócitos primários. Os metabólitos KYN, AA, KA, XA, NA, QA e SER na concentração de 100 μ M e MLT e TRY na concentração de 50 μ M não foram tóxicos as células pois não levaram a morte celular após análise por citometria de fluxo em 24 horas (Tabela 3). O consumo de glicose do meio de cultura foi medido pelo kit Glucose Liquiform® e os metabólitos do Trp não alteraram o consumo de glicose, exceto o metabólito SER, que levou ao aumento do consumo de glicose em cerca de 50% (Tabela 3). Além disso, no ensaio de MTT, utilizado para analisar a atividade mitocondrial, a produção de formazan foi menor quando tratamos as células com SER (Tabela 3).

	Viabilidade Celular (%)	Consumo de Glicose (mg/dL)	Redução do MTT (%)
Controle	83,83 ± 5,40	13,00 ± 1,25	98,33 ± 1,25
KYN	83,77 ± 3,52	12,33 ± 0,47	99,61 ± 3,25
AA	77,20 ± 2,82	12,00 ± 0,47	91,14 ± 1,39
KA	96,37 ± 0,67	10,67 ± 2,45	89,53 ± 5,61
XA	82,23 ± 0,93	12,00 ± 0,47	95,57 ± 3,63
QA	96,67 ± 0,15	14,00 ± 2,05	90,34 ± 2,20
NA	95,07 ± 1,40	10,67 ± 4,90	88,43 ± 2,69
SER	93,33 ± 1,10	25,33 ± 2,05 ***	77,81 ± 4,71 *
MLT	95,70 ± 0,17	13,00 ± 0,94	95,07 ± 15,34
TRY	93,93 ± 2,28	15,33 ± 2,62	88,44 ± 1,89

Tabela 3: Viabilidade Celular por citometria de fluxo, consumo de glicose e ensaio de MTT em melanócitos primários (1×10^5 células/poço) após 24 horas na presença de KYN, AA, KA, XA, QA, NA, SER (100 μ M) e MLT e TRY (50 μ M). Os dados representam média $\pm$ desvio padrão. n=3. * p <0.001 e * p <0,05 comparado ao controle.**

A tabela 4 mostra os efeitos de KYN, AA, KA, XA, QA, NA, SER, MLT e TRY após 24 horas nos produtos finais da glicólise, intermediários do ciclo de Krebs, alguns aminoácidos e moléculas de alta energia no metabolismo, como NADH, ADP e ATP, medido por espectrometria de massa acoplada a cromatografia líquida (HPLC-MS / MS). Os gráficos completos desses resultados encontram-se no material suplementar dessa tese.

μM	Controle	KYN	AA	KA	XA	QA	NA	SER	MLT	TRY
+ Lactate	8,31 $\pm$ 2,14	5,39 $\pm$ 0,51	4,97 $\pm$ 1,98	8,59 $\pm$ 0,80	5,80 $\pm$ 2,10	6,34 $\pm$ 1,71	6,60 $\pm$ 1,86	6,61 $\pm$ 0,57	6,74 $\pm$ 2,05	8,26 $\pm$ 2,47
+ Pyruvate	0,32 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,07	0,31 $\pm$ 0,04	0,28 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,09	0,28 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,02
+ Citrate	20,05 $\pm$ 8,19	9,20 $\pm$ 0,98 ***	12,24 $\pm$ 3,35 *	13,16 $\pm$ 3,72 *	11,18 $\pm$ 0,26 **	10,73 $\pm$ 3,46 *	14,32 $\pm$ 0,21	6,27 $\pm$ 2,42 *	8,11 $\pm$ 1,16 *	7,68 $\pm$ 3,31
+ Succinate	1,56 $\pm$ 0,06	0,65 $\pm$ 0,03 ***	1,05 $\pm$ 0,58	1,11 $\pm$ 0,24	1,62 $\pm$ 1,00	1,23 $\pm$ 0,27	0,97 $\pm$ 0,55	0,79 $\pm$ 0,31 *	1,15 $\pm$ 0,40	0,94 $\pm$ 0,37
+ Fumarate	0,49 $\pm$ 0,11	0,32 $\pm$ 0,01 *	0,37 $\pm$ 0,09	0,35 $\pm$ 0,06	0,54 $\pm$ 0,24	0,45 $\pm$ 0,06	0,42 $\pm$ 0,11	0,33 $\pm$ 0,01	0,45 $\pm$ 0,09	0,33 $\pm$ 0,07
+ Malate	16,43 $\pm$ 7,13	8,54 $\pm$ 2,30 *	11,58 $\pm$ 5,02	11,47 $\pm$ 2,13	16,05 $\pm$ 9,30	10,74 $\pm$ 2,13	11,63 $\pm$ 5,16	8,75 $\pm$ 2,11	14,16 $\pm$ 4,26	10,66 $\pm$ 3,90
+ 2-HG	2,16 $\pm$ 0,78	1,05 $\pm$ 0,13	2,16 $\pm$ 0,78	1,28 $\pm$ 0,20	2,31 $\pm$ 1,38	1,88 $\pm$ 0,20	1,78 $\pm$ 1,13	1,00 $\pm$ 0,31	1,46 $\pm$ 0,44	0,99 $\pm$ 0,35
+ A. Succinate	0,10 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,07	0,07 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,06	0,05 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,04
+ Arginine	74,49 $\pm$ 9,12	75,87 $\pm$ 6,72	37,71 $\pm$ 10,91	71,72 $\pm$ 0,79	92,17 $\pm$ 27,24	59,16 $\pm$ 12,20	54,18 $\pm$ 10,51	52,87 $\pm$ 11,67	63,81 $\pm$ 8,41	77,11 $\pm$ 15,35
+ Glutamine	0,10 $\pm$ 0,11	0,02 $\pm$ 0,00	0,003 $\pm$ 0,003	0,11 $\pm$ 0,14	0,17 $\pm$ 0,11	0,11 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,06	0,09 $\pm$ 0,10	0,08 $\pm$ 0,10	0,06 $\pm$ 0,03
+ Aspartate	1,27 $\pm$ 0,60	0,37 $\pm$ 0,26	0,55 $\pm$ 0,31	0,66 $\pm$ 0,34	3,10 $\pm$ 2,09	1,96 $\pm$ 0,67	2,29 $\pm$ 1,77	0,67 $\pm$ 0,33	0,58 $\pm$ 0,44	0,73 $\pm$ 0,30
+ Asparagine	0,24 $\pm$ 0,09	0,13 $\pm$ 0,08	0,20 $\pm$ 0,12	0,15 $\pm$ 0,08	0,64 $\pm$ 0,64	0,41 $\pm$ 0,24	0,32 $\pm$ 0,12	0,35 $\pm$ 0,09	0,26 $\pm$ 0,13	0,25 $\pm$ 0,05
+ NAD	23,36 $\pm$ 2,00	24,58 $\pm$ 1,15	23,10 $\pm$ 1,05	21,03 $\pm$ 0,93	28,45 $\pm$ 5,75	21,98 $\pm$ 1,59	30,48 $\pm$ 8,81	17,73 $\pm$ 3,58	22,08 $\pm$ 1,62	22,82 $\pm$ 2,48
+ NADH	2,70 $\pm$ 0,47	2,53 $\pm$ 0,38	2,48 $\pm$ 0,49	1,94 $\pm$ 0,28	3,57 $\pm$ 0,79	1,66 $\pm$ 0,31 *	1,75 $\pm$ 0,40	1,60 $\pm$ 0,09	1,82 $\pm$ 0,62	1,88 $\pm$ 0,01
+ NADP	2,92 $\pm$ 0,89	2,25 $\pm$ 0,25	2,74 $\pm$ 0,24	2,37 $\pm$ 0,25	2,53 $\pm$ 0,42	1,78 $\pm$ 0,39	2,69 $\pm$ 0,84	1,82 $\pm$ 0,03 *	2,25 $\pm$ 0,70	2,19 $\pm$ 0,41
+ Adenosine	2,69 $\pm$ 0,18	2,26 $\pm$ 0,15 *	2,28 $\pm$ 0,49	2,19 $\pm$ 0,35	2,98 $\pm$ 1,03	2,19 $\pm$ 0,46	3,90 $\pm$ 1,89	1,88 $\pm$ 0,49	3,13 $\pm$ 0,22	1,27 $\pm$ 0,19 *
+ NMN	0,32 $\pm$ 0,49	0,06 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,08	0,04 $\pm$ 0,03	0,05 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,03
+ AMP	0,17 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,04	0,12 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,08	0,26 $\pm$ 0,09	0,24 $\pm$ 0,10	0,20 $\pm$ 0,07	0,10 $\pm$ 0,00	1,83 $\pm$ 2,36
+ ADP	4,42 $\pm$ 0,25	3,55 $\pm$ 0,16 **	3,37 $\pm$ 0,21 **	2,82 $\pm$ 0,15 **	4,12 $\pm$ 0,25	3,64 $\pm$ 0,77	4,16 $\pm$ 1,32	3,13 $\pm$ 0,59 *	2,60 $\pm$ 0,26 *	1,73 $\pm$ 2,38
+ ATP	15,51 $\pm$ 1,07	14,10 $\pm$ 0,45	13,75 $\pm$ 0,32	12,39 $\pm$ 0,65 *	14,51 $\pm$ 0,21	12,42 $\pm$ 0,54 *	15,06 $\pm$ 5,63	10,98 $\pm$ 0,13 *	11,91 $\pm$ 0,08 *	5,85 $\pm$ 8,21
NAD/NADH	8,99 $\pm$ 1,76	9,97 $\pm$ 1,86	9,54 $\pm$ 1,73	10,97 $\pm$ 1,31	8,19 $\pm$ 2,06	13,70 $\pm$ 3,89	18,34 $\pm$ 8,25	11,11 $\pm$ 2,12	12,85 $\pm$ 3,20	12,25 $\pm$ 1,79
ADP/ATP	0,29 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,02	0,23 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,06	0,28 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,06	0,22 $\pm$ 0,02	0,61 $\pm$ 0,44

Tabela 4: Concentração intracelular dos intermediários do metabolismo energético em melanócitos primários dosados por LCMS. (1×10^5 células/poço) tratadas com KYN, AA, KA, XA, NA, QA e SER (100 μM) e MLT e TRY (50 μM) por 24 horas. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão. (n= 2-3) *** p <0.001, ** p <0.01 e * p <0.05 comparado ao controle. Os resultados estatisticamente significativos estão em negrito.

De maneira geral, as alterações observadas para os melanócitos foram mais sutis do que para os melanomas. A figura 12 evidencia os dados da Tabela 4 para KYN, AA e SER. Enquanto a adição de KYN nos melanomas levou ao aumento da concentração dos metabólitos do ciclo de Krebs, nos melanócitos, houve diminuição da concentração desses metabólitos (citrato, succinato, fumarato e malato), bem como diminuição da adenosina e do ADP. AA também diminui a concentração de citrato e ADP, e SER, diminui a concentração de citrato, NADP, ADP e ATP (Figura 12).

Figura 12: Concentração intracelular dos intermediários do metabolismo energético em melanócitos primários dosados por LCMS. (1×10^5 células/poço) tratadas com KYN, AA e SER (100 μ M) por 24 horas. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão. (n= 2-3). *** p <0.001, ** p <0.01 e * p <0.05 comparado ao controle. As barras brancas representam os controles e as barras pretas representam as condições tratadas com KYN, AA e SER.

Todos os experimentos a seguir foram realizados com esses três metabólitos: KYN, AA e SER. A fim de aprofundar um pouco mais sobre o metabolismo energético dessas células, dosamos lactato separadamente através de dosagem cinética pelo kit específico lactato enzimático da Labtest, pois a quantificação de lactato para os

melanócitos por espectrometria de massas não foi suficientemente sensível. Fizemos a mesma tentativa com o piruvato, utilizando o kit específico piruvato enzimático da Labtest mas não conseguimos detectá-lo devido as baixas concentrações nas amostras.

O lactato foi dosado tanto no sobrenadante da cultura de células, quanto na porção intracelular dos melanócitos. A produção de lactato foi modificada pelos metabólitos do Trp, a concentração de lactato intracelular dobrou após a adição de KYN, e AA, mostrou ter o mesmo efeito, aumentando a concentração de lactato em 50% (Figura 13B). Por outro lado, SER não alterou a concentração de lactato intracelular, mas diminuiu o lactato extracelular (Figura 13A).

Figura 13: Dosagem de lactato no sobrenadante (A) e intracelular (b). KYN, AA e SER (100 μ M) foram adicionados as células (1x10⁵ células por poço) e após 24 horas a análise foi feita por análise cinética. * p < 0,05 e *** p < 0,001 em relação ao controle. n=4.

Seguindo a análise metabólica, avaliamos a atividade de algumas das principais enzimas que definem o curso da via metabólica estudada. KYN aumentou a atividade da hexoquinase (HK) e da citrato sintase (CS), e, AA aumentou a atividade da fosfofrutocinase (PFK). Já SER aumentou a atividade da piruvato quinase (PK) (Figura 14).

Figura 14: Atividade de G6PDH, HK, PFK, PK, CS e LDH medida em melanócitos. (1×10^6 células/poço) tratados com KYN, AA e SER ($100 \mu\text{M}$) por 24 horas. Os dados foram normalizados por miligrama de proteína e representam média $\pm$ desvio padrão. $n=6$. * $p < 0.05$ comparado ao controle.

Dadas as mudanças metabólicas observadas, questionamos se os metabólitos do Trp teriam efeito na função mitocondrial de melanócitos. No ensaio de MTT, usado para analisar a atividade mitocondrial, após adição de SER, a produção de formazan foi reduzida em aproximadamente 20% em melanócitos (esses dados foram incluídos na Tabela 3). Também usamos o Seahorse Bioanalyzer (*Cell mito stress test*) para mensurar as taxas de consumo de oxigênio basal (OCR) e a taxa de acidificação extracelular (ECAR). Nos melanócitos, o KYN diminui a respiração basal e aumentou a ECAR. AA e SER, não alteraram significativamente esses parâmetros (Figura 15).

Figura 15: Consumo basal de oxigênio (OCR) e acidificação extracelular (ECAR) mensurados em melanócitos primários através do Seahorse (*cell mito stress test*)

assay). (1×10^4 células/poço) tratados com KYN, AA e SER ($100 \mu\text{M}$) por 24 horas. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão. $n=3$. * $p < 0.05$ comparado ao controle.

Continuando, avaliamos o efeito desses metabólitos na proliferação celular. O ensaio de crescimento celular independente de ancoragem foi realizado com os melanócitos, porém, devido à baixa taxa de crescimento dessas células, não foi possível a finalização do ensaio. Na contagem de células, observamos que a adição de KYN aumentou o número de células após 48 e 72 horas, e AA também aumentou esses números após 72 horas (Figura 16).

Figura 16: Número de células através de contagem com Azul de Trypan. (1×10^5 células/poço) foram tratadas com KYN, AA e SER ($100 \mu\text{M}$) por 24, 48 e 72 horas. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão. $n=5$. *** $p < 0.001$ e * $p < 0.05$ comparado ao controle.

Por fim, testamos o efeito de alguns metabólitos do metabolismo energético, como lactato, fumarato e succinato ($2,5 \text{ Mm}$), sobre o consumo basal de Trp e produção de seus principais metabólitos. As concentrações utilizadas não foram tóxicas para as células (Figura 17). Diferente dos efeitos observados no metabolismo energético, apenas pequenas modificações foram observadas. Em melanócitos, a incubação de 24 horas com succinato, causou um aumento no consumo de Trp (15%) e a incubação com lactato induziu ao aumento no consumo de XA (25%) (Figura 18).

Figura 17: Viabilidade Celular em melanócitos por citometria de fluxo. (1×10^5 células/poço) após 24 horas na presença de lactato, succinato e fumarato (2,5 mM). Os dados representam média $\pm$ desvio padrão. $n=3$.

Figura 18: Concentração dos metabólitos extracelulares do Trp (via KYN) dosados por LCMS em melanócitos (1×10^5 células/poço) tratadas com fumarato lactato e succinato (2,5 mM) por 24 horas. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão. $n=3$. **

$p < 0.01$ e $* p < 0.05$ comparado ao controle. As linhas vermelhas no gráfico representam a concentração do metabólito presente no meio de cultura.

Figura 19: Concentração dos metabólitos extracelulares do Trp (via SER) dosados por LCMS em melanócitos (1×10^5 células/poço) tratadas com fumarato lactato e succinato (2,5 mM) por 24 horas. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão. As linhas vermelhas no gráfico representam a concentração do metabólito presente no meio de cultura.

Figura 20: Concentração dos metabólitos extracelulares do Trp (via TRY) dosados por LCMS em melanócitos (1×10^5 células/poço) tratadas com fumarato lactato e succinato (2,5 mM) por 24 horas. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão. As linhas vermelhas no gráfico representam a concentração do metabólito presente no meio de cultura.

4.2.2. Discussão

4.2.2.1. Metabólitos da via KYN modificam o metabolismo de melanócitos

Os melanócitos estão presentes em baixa porcentagem na epiderme e se dividem com pouca frequência, menos de duas vezes ao ano (SHAIN e BASTIAN, 2016). A proliferação de melanócitos e a produção de pigmentos são estimuladas pelo dano ao DNA induzido pela radiação UV nos queratinócitos, que subsequentemente secretam o hormônio estimulador dos melanócitos α (α MSH) de forma dependente do p53 (CUI *et al.*, 2007). O que vimos aqui foram os metabólitos da via KYN modificando esse perfil, por exemplo, após o tratamento com KYN e AA, houve aumento no número de células, já que os melanócitos são células de baixa proliferação, esse não é um perfil comumente visto em células primárias.

Os metabólitos do Trp gerados pela via KYN são estudados principalmente em relação aos transtornos oncológicos e de saúde mental e existem poucos estudos que mostram a atividade biológica desses compostos sobre o metabolismo de células normais. Sabe-se que as enzimas da via KYN são expressas em tecidos importantes para a homeostase energética, como o tecido adiposo, músculo esquelético, fígado, pâncreas endócrino, vasos sanguíneos e coração, e são reguladas por sinais nutricionais e inflamatórios (LIU *et al.*, 2018). Além disso, os níveis sistêmicos de KA/QA podem contribuir para a modulação da atividade de células β pancreáticas e XA foi mostrado tendo um efeito diabetogênico (DADVAR *et al.*, 2018).

Os efeitos observados nesse trabalho são inéditos, pois até hoje não foi descrito efeito desses metabólitos sobre o metabolismo de melanócitos. Além de KYN e AA aumentarem a proliferação de melanócitos, esses metabólitos aumentaram a atividade de enzimas-chave da via glicolítica, a hexoquinase (HK) e a Fosfofrutocinase-1 (PFK) e essa alteração foi acompanhada por um aumento na concentração de lactato intracelular. Outro dado que nos chamou a atenção foi que após a adição de KYN, houve aumento da acidificação do meio de cultura dessas células, corroborando com o aumento da produção

de lactato. Essas alterações mostraram que após adição de KYN e AA, os melanócitos priorizaram a via glicolítica como fonte de energia, perfil que não é comumente visto em células normais (LIBERTI e LOCASALE, 2016).

Complementando esses dados, observamos uma diminuição na concentração de metabólitos do ciclo de Krebs, como citrato, malato e succinato, após o tratamento com metabólitos KYN.

As alterações observadas podem ser relevantes quando pensamos em câncer, já que no microambiente tumoral, além das células tumorais, existe uma variedade de células residentes e infiltrantes (BAGHBAN *et al.*, 2020). Sendo assim, o aumento de KYN no microambiente do melanoma, além de ter efeito sobre a própria célula tumoral aumentando o seu fenótipo e favorecendo a progressão do tumor, pode ter efeitos sobre os melanócitos que também favorecem o crescimento tumoral, como por exemplo, o aumento de lactato.

4.2.2.2. Efeitos opostos de SER no metabolismo de melanócitos

O papel dos metabólitos da via SER, especialmente SER e MLT, na regulação do humor e ritmo circadiano são bem definidos (DADVAR *et al.*, 2018). No entanto, alguns papéis no metabolismo energético e na homeostase da glicose vem sendo descritos para esses metabólitos. Por exemplo, a ativação do receptor de melatonina diminui a captação de glicose em adipócitos marrons através da supressão da expressão de GLUT4. Além disso, a melatonina possui efeito nas células β pancreáticas e nos hepatócitos, inibindo a secreção de insulina e aumentando as concentrações plasmáticas de glicose, respectivamente (CONTRERAS-ALCANTARA *et al.*, 2010).

Assim como a melatonina, a serotonina possui efeitos centrais, mas também possui funções periféricas relacionadas a homeostase metabólica. A SER é conhecida por estar associada ao metabolismo da glicose principalmente devido a regulação da secreção de insulina nas células β pancreáticas (WATANABE *et al.*, 2011). Além disso, SER aumenta a captação hepática de glicose em condições hiperglicêmicas e hiperinsulinêmicas (MOORE *et al.*, 2004). Nós observamos aumento no consumo de glicose por melanócitos após a adição de SER. Não existem estudos mostrando o efeito de SER sobre o metabolismo de melanócitos, porém alguns trabalhos já mostraram que SER controla diretamente a captação de glicose nos tecidos periféricos, incluindo o fígado

5. Conclusão

As alterações metabólicas encontradas quando as células de melanoma A375 foram incubadas com KYN e metabólitos da via KYN são importantes pois identificam uma consequência adicional da regulação positiva da IDO observada em muitos tumores. Nossos resultados indicam que, a formação de KYN e outros metabólitos da via KYN no microambiente tumoral causa mudanças metabólicas que trazem vantagens para o tumor, aumentando o fenótipo tumoral. Os efeitos de KYN e seus metabólitos sobre o metabolismo se estendem às células do microambiente, pois há uma intensificação da via glicolítica com produção de lactato nos melanócitos. Por outro lado, SER, um composto da rota metabólica concorrente para a formação de KYN, causa mudanças metabólicas usualmente consideradas desfavoráveis para o tumor, indicando redução do fenótipo tumoral.

É conhecido que a produção de KYN, devido a regulação positiva de IDO, afeta a interação entre a célula tumoral e as células do sistema imunológico e inibidores de IDO tem sido considerada uma das estratégias de tratamento adjuvante antitumoral. Aqui neste estudo, expandimos o conhecimento de como o metabolismo do Trp está intimamente ligado com a progressão do câncer, e acrescenta a ideia promissora de desviar a metabolização do Trp para outras vias competitivas à via KYN como estratégia para tratamento de neoplasias.

6. Referências Bibliográficas

ADAM, J. et al. A role for cytosolic fumarate hydratase in urea cycle metabolism and renal neoplasia. *Cell*, 2013.

ALTMAN, B; STINE, Z; DANG, C. From Krebs to Clinic: Glutamine Metabolism to Cancer Therapy. *Nature Rev. Cancer*, 2016.

ALP, R; NEWSHOLME, A; ZAMMIT, A. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J*, 1976.

AL-ZOAIIRY, R; PEDRINI, M; KHAN, M; ENGL, J; TSCHONER, A; EBENBICHLER, C; GSTRAUNTHALER, G; SALZMANN, K; BAKRY, R; NIEDERWANGER, A. Serotonin improves glucose metabolism by Serotonylation of the small GTPase Rab4 in L6 skeletal muscle cells. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 2017.

BADAWY, A. Targeting tryptophan availability to tumors: the answer to immune escape?. *Immunology & Cell Biology*, 2018.

BADAWY; A. Tryptophan Metabolism: A Versatile Area Providing Multiple Targets for Pharmacological Intervention. *Egypt J Basic Clin Pharmacol*. 2019; doi: 10.32527/2019/101415.

BAGHBAN, R; ROSHANGAR, L; JAHANBAN-ESFAHLAN, R; et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Communication and Signaling*, 2020.

BALASURIYA, D. et al. The Sigma-1 Receptor Binds to the Nav 1.5 Voltage-gated =Na⁺ Channel with 4-Fold Symmetry. *Journal of Biological Chemistry*, 2012.

BALCH, C. M. et al. AJCC Melanoma Staging and Classification. *Journal of Clinical Oncology*, 2009.

BARTH, M. C. et al. Kynurenic Acid Triggers Firm Arrest of Leukocytes to Vascular Endothelium under Flow Conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 2009.

BARTSCH, C; BARTSCH, H; KARASEK, M. Melatonin in clinical oncology. *Neuro Endocrinol Lett*, 2002.

BERG, J.M; TYMOCZKO, J.L; STRYER, L. Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman, 2002.

BHUTIA, Y; BABU, E; GANAPATHY, V. Interferon- γ induces a tryptophan-selective amino acid transporter in human colonic epithelial cells and mouse dendritic cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015.

BOROWICZ, S; VAN SCOYK, M; AVASARALA, S; KARUPPUSAMY RATHINAM, MK; TAULER, J; BIKKAVILLI, RK; WINN, RA. The soft agar colony formation assay. *J Vis Exp*, 2014.

BOSCO, M. C. et al. Macrophage activating properties of the tryptophan catabolite picolinic acid. *Developments in Tryptophan and Serotonin Metabolism*, 2003.

BRAGA, M: Effects of light on tryptophan metabolism in melanocytes and melanomas. <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9136/tde-25042017-171354/pt-br.phpb> (2017). Accessed 23 Jul 2020.

BRANDNER, J. M; HAASS, N. K. Melanoma's connections to the tumour microenvironment. *Pathology*, 2013.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem*, 1976.

BRANQUINHO, M. BRAGA, M; CLARA, R; RIVELIS, A; MARIA-ENGLER, S; PINTO, E; CAMPA, A. 1-Methyl-tryptophan enantiomers differently affect the cross- talking between mononuclear and tumor cells and interferon- γ production. *BioRxiv*, the preprint server for biology, 2019.

CHIARUGI, A. et al. The NAD metabolome - a key determinant of cancer cell biology. *Nature Reviews Cancer*, 2012.

CHUANG, A. C; FANIDI, A; UELAND, P. M. et al. Circulating biomarkers of tryptophan and the kynurenine pathway and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014; doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0770.

CHUNG, K.T; GADUPUDI, G. S. Possible Roles of Excess Tryptophan Metabolites in Cancer. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2011.

CLARA, R. O; ASSMANN, N; RAMOS-MORENO, A. C; COIMBRA, J. B; NURENBERGER, N; DETTMER-WILDE, K; OEFNER, P. J; CAMPA, A. Melanocytes are more responsive to IFN- γ and produce higher amounts of kynurenine than melanoma cells. *Biol Chem.* 2016; doi: 10.1515/hsz-2015-0173.

COLLINS, R; PATEL, K; PUTNAM, W; KAPUR, P; RAKHEJA, D. Oncometabolites: A New Paradigm for Oncology, Metabolism, and the Clinical Laboratory. *Clin Chem.* 2017; doi: 10.1373/clinchem.2016.267666.

CONTRERAS-ALCANTARA, S; BABA, K; TOSINI, G. Removal of melatonin receptor type 1 induces insulin resistance in the mouse. *Obesity* 2010; 18: 1861–3.

COSTA, A. S; FREZZA, F. Metabolic reprogramming and oncogenesis: one hallmark, many organelles. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2017; doi: 10.1016/bs.ircmb.2017.01.001.

COWEN, P. J; BROWNING, M. What has serotonin to do with depression?. *World Psychiatry.* 2015; doi: 10.1002/wps.20229.

CRABTREE, B; HIGGINS, J; NEWSHOLME, A. The activities of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxylase and fructose diphosphatase in muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem J,* 1972.

CUI, R; WIDLUND, H; FEIGE, E; LIN, J; WILESKY, D; IGRAS, V; DÓRAZIO, J; FUNG, C; SCHANBACHER, C; GRANTER, S; FISHER, D. Central Role of p53 in the Suntan Response and Pathologic Hyperpigmentation. *Cell,* 9;128(5):853-64, 2007. doi: 10.1016/j.cell.2006.12.045.

DADVAR, S; FERREIRA, D; CERVENKA, I; RUAS, J. The weight of nutrients: kynurenine metabolites in obesity and exercise. *Journal of International Medicine,* 2018.

DAN, Y; KUN-LIANG, G; YUE, X. Metabolism, Activity, and Targeting of D-and L-2-Hydroxyglutarates. *Trends Cancer,* 2018.

DAR, S; CHHINA, J; MERT, I; CHITALE, D; BUEKERS, T; KAUR, H; GIRI, S; MUNKARAH, A; RATTAN, R. Bioenergetic adaptations in chemoresistant ovarian cancer cells. *Sci Rep.* 2017; doi: 10.1038/s41598-017-09206-0.

DEBERARDINIS, R. J; LUM, J. J; HATZIVASSILIOU, G; THOMPSON, C. B. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 7, 11-20, 2008.

DEBERARDINIS, R.J; MANCUSO, A; DAIKHIN, E; NISSIM, I; YUDKOFF, M. et al. Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *PNAS*, 2007.

DECAESTECKER, C; DEBEIR, O; VAN-HAM, P; KISS, R. Can anti-migratory drugs be screened in vitro? A review of 2D and 3D assays for the quantitative analysis of cell migration. *Medicinal Research Reviews*, 2007.

DELAGE, B. et al. Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer. *Int. J. Cancer*, 2010.

DESIDERI, E; VEGLIANTE, R.; CIRIOLO M. Mitochondrial dysfunctions in cancer: Genetic defects and oncogenic signaling impinging on TCA cycle activity. *Cancer Letters*, 2015.

DIAZ-RUIZ, R; RIGOLET, M; DEVIN, A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011.

DILLON, B.J; PRIETO, V.G; CURLEY, S.A; ENSOR, C.M; HOLTSBERG, F.W; BOMALASKI, J.S; CLARK, M.A. Incidence and distribution of argininosuccinate synthetase deficiency in human cancers: a method for identifying cancers sensitive to arginine deprivation. *Cancer*, 2004.

DINATALE, B. C. et al. Kynurenic Acid Is a Potent Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand that Synergistically Induces Interleukin-6 in the Presence of Inflammatory Signaling. *Toxicological Sciences*, 2010.

DIVITO, S. J; FERRIS, L. K. Advances and short comings in the early diagnosis of melanoma. *Melanoma Research*, 2010.

EGGERMONT, A. M. M; SPATZ, A; ROBERT, C. Cutaneous melanoma. *Lancet*, 2014.

FAUBERT, B; LI, K. Y; CAI, L. et al. Lactate metabolism in human lung tumors. *Cell* 171, 358-371.e9, 2017.

FENG, D. U; XIAODI, Z; DAIMING, F. Soft Agar Colony Formation Assay as a Hallmark of Carcinogenesis. *Bio-Protocol*. 2017; doi: 10.21769/BioProtoc.2351.

FERNS, D; KEMA, I; BUIST, M; NIJMAN, H; KENTER, H; JORDANOVA, E. Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) metabolic activity is detrimental for cervical cancer patient survival. *Oncoimmunology*. 2015; doi: 10.4161/2162402X.2014.981457.

FONTANILLA, D. et al. The hallucinogen N,N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator. *Science*, 2009.

FOTOPOULOU, C. et al. Systemic Changes of Tryptophan Catabolites via the Indoleamine-2,3-dioxygenase Pathway in Primary Cervical Cancer. *Anticancer Research*, 2011.

FRUMENTO, G. et al. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Journal of Experimental Medicine*, 2002.

GAJEWSKI, T. F; SCHREIBER, H; FU, Y. X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology*, 2013.

GAMEIRO, P.A, et al. In vivo HIF-mediated reductive carboxylation is regulated by citrate levels and sensitizes VHL-deficient cells to glutamine deprivation. *Cell Metabolism*, 2013.

GARTHWAITE, J. Neuronal nitric oxide synthase and the serotonin transporter get harmonious. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; doi: 10.1073/pnas.0702508104.

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

GRAMATZKI, D. et al. Aryl hydrocarbon receptor inhibition downregulates the TGF-beta/Smad pathway in human glioblastoma cells. *Oncogene*, 2009.

GUILLEMIN, G. J. et al. Characterization of the kynurenine pathway in human neurons. *Journal of Neuroscience*, 2007.

GUO, B. *et al.* Naringin suppresses the metabolism of A375 cells by inhibiting the phosphorylation of c-Src. *Tumour Biol*. 2016.

HAJDUCH, E; RENCUREL, F; BALENDRAN, A; BATTY, IH; DOWNES, P; HUNDAL, H. Serotonin (5-Hydroxytryptamine), a novel regulator of glucose transport in rat skeletal muscle.

HANAHAN, D; WEINBERG, R. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000.

HANAHAN, D; WEINBERG, R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011.

HEATH-PAGLIUSO, S. et al. Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry*, 1998.

HEIDEN, M; CANTLEY, L; THOMPSON, C. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. National institute of health, 2009.

HEIDEN, M; DEBERARDINIS, J. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell*, 2017.

HENG, B; LIM, C; LOVEJOY, D; BESSEDE, Y; GLUCH, L; GUILLEMIN, G. Understanding the role of the kynurenine pathway in human breast cancer immunobiology. *Oncotarget*. 2016; doi: 10.18632/oncotarget.6467.

HENGARTNER, H; HARRIS, I. Purification by affinity chromatography, properties and crystallisation of phosphofructokinase from thermophilic micro-organisms. *FEBS Lett*, 1975. *J Biol Chem*, 1999.

HORNYÁK, L; DOBOS, N; KONCZ, et al. The Role of Indoleamine-2,3-Dioxygenase in Cancer Development, Diagnostics, and Therapy. *Front Immunol*. 2018; doi: 10.3389/fimmu.2018.00151.

INFANTINO, V; CONVERTINI, P; CUCCI, L; PANARO, M.A. et al. The mitochondrial citrate carrier: a new player in inflammation. *Biochem*, 2011.

INO, K. et al. Inverse correlation between tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with disease progression and survival. *Clin Cancer Res*, 2008.

INTLEKOFER, A. M; WANG, B; LIU, H; SHAH, H; CARMONA-FONTAINE, C; RUSTENBURG, A. S; SALAH, S; GUNNER, M. R; CHODERA, J. D; CROSS, J. R; THOMPSON, C. B. L-2-Hydroxyglutarate production arises from noncanonical enzyme function at acidic pH. *Nat Chem Biol*. 2018; doi: 10.1038/nchembio.2307.

JIANRONG, LUA; MING, TANB; QINGSONG, CAIA. The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Lett*, 2015.

JUHASZ, C. et al. Tryptophan metabolism in breast cancers: molecular imaging and immunohistochemistry studies. *Nuclear Medicine and Biology*, 2012.

JURATLI, T.A; KIRSCH, K; GEIGER, K; KLINK, B; LEIPNITZ, E; PINZER, T; SOUCEK, S; SCHOROK, E; SCHACKERT, G; KREX, D. The prognostic value of IDH mutations and MGMT promoter status in secondary high-grade gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 2012.

KESARWANI, P; PRABHU, A; KANT, S. et al. Tryptophan Metabolism Contributes to Radiation-Induced Immune Checkpoint Reactivation in Glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2018; doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0041.

KESHET, R; EREZ, A. Arginine and the metabolic regulation of nitric oxide synthesis in cancer. *Dis Model Mech*. 2018; doi: 10.1242/dmm.033332.

KIM, S. Y. Cancer Energy Metabolism: Shutting Power off Cancer Factory. *Biomol Ther* 26(1), 39-44, 2018.

KINDLER, J; LIM; WEICKERT, C; BOERRIGTER, D; GALLETLY, C; LIU, D; et al. Dysregulation of kynurenine metabolism is related to proinflammatory cytokines, attention, and prefrontal cortex volume in schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2019; doi: 10.1038/s41380-019-0401-9.

KIM, S. Y. Cancer Energy Metabolism: Shutting Power off Cancer Factory. *Biomol Ther* (Seoul). 2018; doi: 10.4062/biomolther.2017.184.

KIM, R; EMI, M; TANABE, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 2007.

KRAMER, N; WALZL, A; UNGER, C; ROSNER, M; KRUPITZA, G; HENGSTSCHLAEGER, M. et al. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 2013.

KROEMER, G; POUYSSEGUR, J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*, 2008.

KUDRYAVTSEVA, A. *et al*. Effect of lentivirus-mediated shRNA inactivation of HK1, HK2, and HK3 genes in colorectal cancer and melanoma cells. *BMC Genet*, 2016.

KUO, M; SAVARAJ, N; FEUN, L. Targeted cellular metabolism for cancer chemotherapy with recombinant arginine-degrading enzymes. *Oncotarget*, 2010.

LABROUSSE, A. L. et al. Stromal reaction in cutaneous melanoma. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 2004.

LEPPANEN, V. V; OKA, M. Metabolism of tryptophan in cancer of various sites. *Annales Medicinae Experimentalis Et Biologiae Fenniae*, 1963.

LEONE, R; POWELL, J. Metabolism of immune cells in cancer. *Nat Rev Cancer*, 20(9):516-531, 2020.

LI, Y; LI, S; ZHOU, Y; MENG, X; ZHANG, J; XU, D; LI, H. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. *Oncotarget*, 2017.

LIBERTI, M; LOCASALE, J. The Warburg effect: Hoe does it benefit cancer cells?. *Trends Biochem*, 2016.

LIEU, E; NGUYEN, T; RHYNE, S; KIM, J. Amino acids in cancer. *Experimental & Molecular Medicine* volume 52, pages15–30, 2020.

LIN, X; SUN, R; ZHAO, X; ZHU, D; ZHAO, X; GU, Q; DONG, X; ZHANG, D; ZHANG, Y; LI, Y; SUN, B. C-myc overexpression drives melanoma metastasis by promoting vasculogenic mimicry via c-myc/snail/Bax signaling. *J Mol Med (Berl)*. 2017; doi: 10.1007/s00109-016-1452-x.

LISSONI, P. et al. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuro Endocrinol Lett*, 2001.

LIU, J; MOVASSAT, J; PORTHA, B. Emerging role for kynurenines in metabolic pathologies. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2019.

LIU, Y; WU, H-W; SHEARD, M.A; SPOSTO, R; SOMANCHI, S.S; COOPER, L.JN. et al. Growth and Activation of Natural Killer Cells Ex Vivo from Children with Neuroblastoma for Adoptive Cell Therapy. *Clinical Cancer Research*, 2013.

LOAYZA-PUCH, F. et al. Tumour-specific proline vulnerability uncovered by differential ribosome codon reading. *Nature*, 2016.

LOEFFEK, S. et al. Melanoma cell derived vascular endothelial growth factor induces endothelial tubulogenesis within fibrin gels by a metalloproteinase mediated mechanism. *European Journal of Cell Biology*, 2006.

LUENGO, A; GUI, D; HEIDEN, M. Targeting metabolism for cancer therapy. *Cell Chem Biol*. 2017; doi: 10.1016/j.chembiol.2017.08.028.

LUKEY, M; KATTI, W; CERIONE, R. Targeting amino acid metabolism for cancer therapy. *Drug Discovery Today*, 2016.

MATTAINI, K.R. et al. The importance of serine metabolism in cancer. *J. Cell Biol*, 2016.

MADDOCKS, O.D. et al. Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature*, 2013.

MCGIVAN, J.D; PASTOR-ANGLADA, M. Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acid transport. *Biochem*, 1994.

MELLOR, A.L; MUNN, D.H. IDO expression by dendritic cells: Tolerance and tryptophan catabolism. *Nature Reviews Immunology*, 2004.

MOON, Y; HAJJAR, J; NAING, A. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *J Immunother Cancer*. 2015; doi: 10.1186/s40425-015-0094-9.

MOORE, M. C; GEHO, W. B; LAUTZ, M; et al. Portal infusion and glucose disposal in conscious dogs. *Diabetes* 2004; 53:14–20.

MOORE, M. C; KIMURA, K; SHIBATA, H; et al. Portal 5-hydroxytryptophan infusion enhances glucose disposal in conscious dogs. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289:E225–E231.

MORANDI, A; CHIARUGI, P. Metabolic implication of tumor:stroma crosstalk in breast cancer, 2014.

MORENO, A. C; CLARA, R. O; COIMBRA, J. B; JÚLIO, A. R; ALBUQUERQUE, R. C; OLIVEIRA, E. M; MARIA-ENGLER, S. S; CAMPA, A. The expanding roles of 1-methyl-tryptophan (1-MT): in addition to inhibiting kynurenine production, 1-MT activates the synthesis of melatonin in skin cells. *FEBS J*. 2013; doi: 10.1111/febs.12444.

MULLEN, A; WHEATON, W; KIN, E; CHEN, P.H; SULLIVAN, L; CHENG, T; YANG, Y; LINEHAN, W; CHANDEL, N; DEBERARDINIS, R. Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature Rev. Cancer*, 2012.

MULLER, A; SCHERLE, P. Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 2006.

MUNN, D; MELLOR, A. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest*, 2007.

MURAKAMI, K; HANEDA, M; YOSHINO, M. *BioMetals*, 2006.

NISSEN, D; PAJEĆKA, K; STRIDH, H; SKYTT, D; WAAGEPETERSEN, H. Dysfunctional TCA-Cycle Metabolism in Glutamate Dehydrogenase Deficient Astrocytes. *Glia*, 2015.

NTAYI, C. et al. Elastin derived peptides upregulate matrix metalloproteinase-2-mediated melanoma cell invasion through elastin binding protein. *Journal of Investigative Dermatology*, 2004.

OGYU, K; KUBO, K; NODA, Y; et al. Kynurenine pathway in depression: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev.* 2018; doi: 10.1016/j.neubiorev.2018.03.023.

OHKAME, H; MASUDA, H; ISHII, Y; KANAI, Y. Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (4F2hc) in liver tumor lesions of rat models. *J Surg Oncol*, 2001.

OLIVEIRA, A. et al. Sustained kidney biochemical derangement in treated experimental diabetes: a clue to metabolic memory. *Scientific Reports*, 2017.

OPITZ, C. A. et al. The Indoleamine-2,3-Dioxygenase (IDO) Inhibitor 1-Methyl-D-tryptophan Upregulates IDO1 in Human Cancer Cells. *Plos One*, 2011.

PALSSON-MCDERMOT, E; O'NEIL, L. The Warburg effect then and now: From cancer to inflammatory diseases. *Bioessays*, 2013.

PARLO, R; COLEMAN, R. Enhanced rate of citrate export from cholesterol-rich hepatoma mitochondria. The truncated Krebs cycle and other metabolic ramifications of mitochondrial membrane cholesterol, *J. Biol. Chem*, 1984.

PARLO, R; COLEMAN, P. Continuous pyruvate carbon efflux to newly synthesized cholesterol and the suppressed evolution of pyruvate generated CO₂ in tumors: further evidence for a truncated Krebs cycle in hepatomas. *Biochim Biophys Acta*, 1986.

PEARCE, E. et al. Metabolic Pathways in Immune Cell Activation and Quiescence. *Immunity*, 2013.

PEREGRIN, A; AHLMAN, H; JODAL, M; LUNDGREN, O. Involvement of serotonin and calcium channels in the intestinal fluid secretion evoked by bile salt and cholera toxin. *Br J Pharmacol*, 1999.

PERSI, E; DURAN-FRIGOLA, M; DAMAGHI, M; ROUSH, W. R; ALOY, P; CLEVELAND, J. L; GILLIES, R. J; RUPPIN, E. Systems analysis of intracellular pH vulnerabilities for cancer therapy. *Nat Commun.* 2018; doi: 10.1038/s41467-018-05261-x.

PILOTTE, L. et al. Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012.

PLATTEN, M; WICK, W; VAN DEN EYNDE, B. J. Tryptophan Catabolism in Cancer: Beyond IDO and Tryptophan Depletion. *Cancer Research*, 2012.

POLLARD, P. J. et al. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1 α in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum. Mol. Genet.*, 2005.

PUC CETTI, P; FALLARINO, F; ITALIANO, A. et al. Accumulation of an endogenous tryptophan-derived metabolite in colorectal and breast cancers. *PLoS One.* 2015; doi: 10.1371/journal.pone.0122046.

RABINOVICH, S. et al. Diversion of aspartate in ASS1-deficient tumours fosters de novo pyrimidine synthesis. *Nature*, 2015.

RAHMAN, A.M.A; PAWLING, J; RYCZKO, M; CAUDY, A.A; DENNIS, J.W. Targeted metabolomics in cultured cells and tissues by mass spectrometry: method development and validation. *Anal Chim Acta*, 2014.

RAVINDRA, T; LAKSHMI, N; AHUJA, Y. Melatonin in pathogenesis and therapy of cancer. *Indian J Med Sci*, 2006.

RIBA, J. et al. Psychometric assessment of the Hallucinogen Rating Scale. *Drug Alcohol Depend*, 2011.

RIZI, S; ACHREJA, A; NAGRATH, D. Nitric Oxide: The Forgotten Child of Tumor Metabolism. *Trends Cancer.* 2017; doi: 10.1016/j.trecan.2017.07.005.

RUITER, D. et al. Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. *Lancet Oncology*, 2002.

SAINZ, R. et al. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci*, 2003.

SARROUILHE, D; CLARHAUT, J; DEFAMIE, N; MESNIL, M. Serotonin and cancer: what is the link? *Curr Mol Med*. 2015; doi: 10.2174/1566524015666150114113411.

SERASINGHE, M. N; WIEDER, S. Y; RENAULT, T. T. et al. Mitochondrial division is requisite to RAS-induced transformation and targeted by oncogenic MAPK pathway inhibitors. *Mol Cell*. 2015; doi: 10.1016/j.molcel.2015.01.003.

SHAH, G. M. et al. Biochemical assessment of niacin deficiency among carcinoid cancer patients. *American Journal of Gastroenterology*, 2005.

SHIMIZUA, A; KAIRAB, K; KATOA, M. et al. Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in cutaneous melanoma. *Melanoma Research*, 2015.

SCHULZE, A; HARRIS, A. L. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature*. 2012; doi: 10.1038/nature11706.

SCHWARCZ, R; STONE, T. W. The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises. *Neuropharmacology*. 2017; doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.08.003.

SHAIN, A; BASTIAN, B. (2016) From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*, 16(6):345-58. doi: 10.1038/nrc.2016.37.

SILK, J; LAKHAL, S; LAYNES, R. et al. IDO indices expression of a novel tryptophan transporter in mouse and human tumor cells. *J Immunol*, 2011.

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*, 2004.

SLATER, E.C; BORNER, W.D. The effect of fluoride on the succinic oxidase system. *Biochem J*, 1952.

SONVEAUX, P; VEGAN, F; SCHROEDER, T; et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J. Clin. Invest*. 118, 3930- 3942, 2008.

SPEECKAERT, R. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase, a new prognostic marker in sentinel lymph nodes of melanoma patients. *European Journal of Cancer*, 2012.

SULLIVAN, L. B. et al. Supporting aspartate biosynthesis is an essential function of respiration in proliferating cells. *Cell*, 2015.

SULLIVAN, L.B; GUI, D; HEIDEN, M. Altered metabolite levels in cancer: implications for tumour biology and cancer therapy. *Nature Rev. Cancer*, 2016.

TEULINGS, F. A. et al. Concentration of free and conjugated 3-hydroxyanthranilic acid in urine of bladder tumor patients before and after therapy, measured with an enzymatic method. *British Journal of Cancer*, 1973.

TISZLAVICZ, Z. et al. Different inhibitory effects of kynurenic acid and a novel kynurenic acid analogue on tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production by mononuclear cells, HMGB1 production by monocytes and HNP1-3 secretion by neutrophils. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2011.

TOURINO, M. C; DE OLIVEIRA, E. M; BELLÉ, L. P; KNEBEL, F. H; ALBUQUERQUE, R. C; DÖRR, F. A; OKADA, S. S; MIGLIORINI, S; SOARES, I. S; CAMPA, A. Tryptamine and dimethyltryptamine inhibit indoleamine 2,3 dioxygenase and increase the tumor-reactive effect of peripheral blood mononuclear cells. *Cell Biochem Funct.* 2013; doi: 10.1002/cbf.2980.

TORMO, D. et al. Targeted Activation of Innate Immunity for Therapeutic Induction of Autophagy and Apoptosis in Melanoma Cells. *Cancer Cell*, 2009.

TROTTA, A; GALLES, J; SERASINGHE, M. et al. Disruption of mitochondrial electron transport chain function potentiates the pro-apoptotic effects of MAPK inhibition. *J Biol Chem.* 2017; doi: 10.1074/jbc.M117.786442.

VENANCIO, P; CONSOLARO, M; DERCHAIN, S; BOCCARDO, E; VILLA, L; STUCHI, S; CAMPA, A; DISCACCIATI, M. Indolamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase expression in HPV infection, SILs, and cervical cancer. *Cancer Cytopathol.* 2019; doi: 10.1002/cncy.22172.

VENKATESWARAN, N; LAFITA-NAVARRO, M. C; HAO, Y. H. et al. MYC promotes tryptophan uptake and metabolism by the kynurenine pathway in colon cancer. *Genes Dev.* 2019; doi: 10.1101/gad.327056.119.

VICAUT, E; LAEMMEL, E; STICKER, O. Impact of serotonin on tumour growth. *Annals of Medicine*. 2000; doi: 10.3109/07853890008998826.

WALLACE, D. Mitochondrial function and cancer. *Nature reviews cancer*, 2012.

WANG, F. et al. Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science*, 2013.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells, *Science*, 1956.

Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269-270, 1956.

WATANABE, H; ROSE, M. T; ASO, H. Role of peripheral serotonin in glucose and lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 22(3), 186–191, 2011.

WEBER, W. P. et al. Differential effects of the tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid on the proliferation of human CD8(+) T cells induced by TCR triggering or homeostatic cytokines. *European Journal of Immunology*, 2006.

WEINLICH, G. et al. Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients. *Dermatology*, 2007.

YANAGIDA, O; KANAI, Y; CHAIROUNGDU, A; KIM, D.K; SEGAWA, H; NII, T. et al. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta*, 2001.

YANG, LIFENG; VENNET, S; NARGATH, D. Glutaminolysis: a hallmark of cancer metabolism. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2017.

YASUI, H. et al. Interferon enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase its possible occurrence in cancer patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986.

XIAO, M. et al. Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes Dev.*, 2012.

XUE-BING, LI; JUN-DONG, GU; QING-HUA, ZHOU. Review of aerobic glycolysis and its key enzymes – new targets for lung cancer therapy. *Thorac Cancer*, 6(1): 17–24, 2015. doi: 10.1111/1759-7714.12148.

ZAIDI, N; SWINNEN, J. V; SMANS, K. ATP-citrate lyase: a key player in cancer metabolism. *Cancer Res.* 72, 3709-3714, 2012.

ZAMINPIRA, S; ZAMINPIRA, S; NIKNAMIAN, S. The Impact of the Serotonin on the Cause and Treatment of Cancer. *International Journal of Cancer and Oncology*, 2017.

ZAMMIT, A; BEIS, I; NEWSHOLME, A. Maximum activities and effects of fructose bisphosphate on pyruvate kinase from muscles of vertebrates and invertebrates in relation to the control of glycolysis. *Biochem J*, 1978.

ZAHER, S. S. et al. 3-Hydroxykynurenine Suppresses CD4(+) T-Cell Proliferation, Induces T-Regulatory-Cell Development, and Prolongs Corneal Allograft Survival. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2011.

ZHANG, J; FAN, J; VENNETI, S; CROSS, J.R; BHINDER, B; DJABALLAH, H; KANAI, M; CHENG, E.H; JUDKINS, A.R; PAWEL, B; BAGGS, J; CHERRY, S; RABINOWITZ, J.D; THOMPSON, C.B. Asparagine plays a critical role in regulating cellular adaptation to glutamine depletion. *Mol Cell*, 2014.

7. Material suplementar

A sequência de figuras 22 a 30 são relativas as modificações causadas em melanócitos e melanomas após adição dos metabólitos do Trp. A síntese desses resultados foi apresentada nas tabelas 2 e 4.

A

B

Figura 22: Efeito de KYN sobre o metabolismo de melanócitos (A) e melanomas (B).

KYN (100μM) foi adicionado as células (1×10^5 células por poço) e após 24 horas a análise foi feita por espectrometria de massas. (n= 2-3) * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001 em relação ao controle.

A

B

Figura 23: Efeito de AA sobre o metabolismo de melanócitos (A) e melanomas (B). AA ($100\mu\text{M}$) foi adicionado as células (1×10^5 células por poço) e após 24 horas a análise foi feita por espectrometria de massas. (n= 2-3) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

A

B

Figura 24: Efeito de KA sobre o metabolismo de melanócitos (A) e melanomas (B). KA (100µM) foi adicionado as células (1×10^5 células por poço) e após 24 horas a análise foi feita por espectrometria de massas. (n= 2-3) * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001 em relação ao controle.

A

B

Figura 25: Efeito de XA sobre o metabolismo de melanócitos (A) e melanomas (B). XA (100μM) foi adicionado as células (1×10^5 células por poço) e após 24 horas a análise foi feita por espectrometria de massas. (n= 2-3) * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001 em relação ao controle.

A

B

Figura 26: Efeito de QA sobre o metabolismo de melanócitos (A) e melanomas (B).

QA (100µM) foi adicionado as células (1×10^5 células por poço) e após 24 horas a análise foi feita por espectrometria de massas. (n= 2-3) * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001 em relação ao controle.

A

B

Figura 27: Efeito de NA sobre o metabolismo de melanócitos (A) e melanomas (B).

NA (100µM) foi adicionado as células (1×10^5 células por poço) e após 24 horas a análise foi feita por espectrometria de massas. (n= 2-3) * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001 em relação ao controle.

A

B

Figura 28: Efeito de SER sobre o metabolismo de melanócitos (A) e melanomas (B). SER (100 μM) foi adicionado as células (1×10^5 células por poço) e após 24 horas a análise foi feita por espectrometria de massas. (n= 2-3) * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001 em relação ao controle.

A

B

Figura 29: Efeito de MLT sobre o metabolismo de melanócitos (A) e melanomas (B). MLT (50µM) foi adicionado as células (1×10^5 células por poço) e após 24 horas a análise foi feita por espectrometria de massas. (n= 2-3) * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001 em relação ao controle.

A

B

Figura 30: Efeito de TRY sobre o metabolismo de melanócitos (A) e melanomas (B).

TRY (50µM) foi adicionado as células (1×10^5 células por poço) e após 24 horas a análise foi feita por espectrometria de massas. (n= 2-3) * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001 em relação ao controle.

8. Anexos

Anexo I – Sugestão de Avaliação de Defesa

Anexo II – Histórico Escolar

Anexo III – Currículo Lattes

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

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

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

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

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

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

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

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

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

São Paulo, 23 de maio de 2014.

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

9142 - 9229404 / 1 - Maysa Braga Barros Silva

Email: maysabraga@usp.br

Data de Nascimento: 16/02/1993

Cédula de Identidade: RG - 49.221.351-3 - SP

Local de Nascimento: Estado de São Paulo

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Bacharel em Farmácia - Universidade Cruzeiro do Sul - São Paulo - Brasil - 2014

Mestrado: Mestra em Ciências - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2017

Curso: Doutorado

Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Área: Fisiopatologia

Data de Matrícula: 10/04/2017

Início da Contagem de Prazo: 10/04/2017

Data Limite para o Depósito: 12/04/2021

Orientador: Prof(a). Dr(a). Ana Campa - 10/04/2017 até 24/03/2021 Email: anacampa@usp.br

Proficiência em Línguas:

Inglês, Aprovado em 10/04/2017

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 09/05/2019

Data do Depósito do Trabalho: 19/01/2021

Título do Trabalho: "Integração metabólica no microambiente tumoral: metabolismo energético versus metabolismo do triptofano"

Data Máxima para Aprovação da Banca: 05/03/2021

Data de Aprovação da Banca: 03/02/2021

Data Máxima para Defesa: 19/05/2021

Data da Defesa: 24/03/2021

Resultado da Defesa: Aprovado

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 10/04/2017
Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 27/07/2020

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
Crédito Externo	Metabolismo Tumoral (1)	31/03/2017	07/07/2017	-	6	90	T	-	-
FBT5776-5/5	Tópicos Especiais de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II	07/07/2017	20/07/2017	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5766-6/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia IV	15/08/2017	27/11/2017	15	1	100	A	N	Concluída
MCM5923-1/2	Mecanismos de Carcinogênese (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	17/10/2017	30/10/2017	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
Atividade do Programa	Etapa de Preparação Pedagógica no 1º Sem./2018, modalidade Disciplina, Estágio Supervisionado em Docência, com carga horária 120 horas, do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0416 Fisiopatologia II, do Dep. de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, ministrada aos alunos de graduação, sob a supervisão da Profa. Tania	01/02/2018	30/06/2018	-	3	100	-	-	-

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
Marcourakis. (2)									
FBC5792-5/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia III	05/03/2018	19/06/2018	15	1	75	A	N	Concluída
FBC5885-1/1	Aplicações de Cromatografia e Espectrometria de Massas em Toxicologia	07/05/2018	17/06/2018	90	6	90	A	N	Concluída
ICB5752-1/5	Como Comunicar Sua Ciência: Melhorando a Oratória e a Empatia com o Público (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	27/08/2018	10/09/2018	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5956-1/1	Atualização e Revisão de Modelos de Pele	04/02/2019	10/02/2019	30	2	100	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos			Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	23
Estágios:			
Total:	0	20	23

Créditos Atribuídos à Tese:

167

Observações:

1) Disciplinas(s) cursada(s) na(o) Universidade Federal de São Paulo. Atribuição de créditos aprovada pelo(a) Comissão de Pós-Graduação em Sessão de 13/09/2017

Observações:

2) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 06/02/2019

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.

Comissão julgadora da tese de doutorado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
55700	Ana Campa	FCF - USP	Presidente
380040	Durvanei Augusto Maria	BUTANTA(FMVZ)	
3368462	Silvy Stuchi Maria Engler	FCF - USP	
208846	Elaine Hatanaka	UNICSUL - Externo

Este documento eletrônico dispensa carimbo e assinatura. Sua autenticidade pode ser comprovada fornecendo-se o código de controle na seguinte página da Universidade de São Paulo: <https://uspdigital.usp.br/iddigital>

Documento emitido às 16:52:36 horas do dia 06/04/2021 (hora e data de Brasília)

Código de controle: 2RTD-8KD3-1TRL-VHBM

Código de controle válido até: 06/05/2021

Maysa Braga Barros Silva

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

Última atualização do currículo em 25/03/2021

Resumo informado pelo autor

Farmacêutica pela Universidade Cruzeiro do Sul, Mestre em Ciências (Área: Análises Clínicas) e Doutora em Ciências (Área: Fisiopatologia) pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Atualmente é Professora na Universidade Cruzeiro do Sul ministrando as disciplinas de Bioquímica Geral e Clínica, Patologia, Imunologia Geral e Clínica e Parasitologia Geral e Clínica para o curso de Farmácia. Em 2020 atuou como docente no Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU), onde ministrou aulas de Estágio em Análises Clínicas para o curso de Farmácia.

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Maysa Braga Barros Silva

Dados pessoais

Filiação Edson Luis Barros da Silva e Maria Odete Braga

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

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

CPF 420.728.748-58

Endereço residencial Rua Pacheco Gato, 182 Torre 2 APTO 64
Jardim Nove de Julho - São Paulo
03951060, SP - Brasil
Telefone: 11 35009605
Celular 11 963762868

Endereço eletrônico E-mail para contato : maysa_braga@hotmail.com
E-mail alternativo maysabraga@usp.br

Formação acadêmica/titulação

2017 - 2021 Doutorado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Integração metabólica no microambiente tumoral: metabolismo energético versus metabolismo do triptofano., Ano de obtenção: 2021

Orientador: Ana Campa
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2015 - 2017 Mestrado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Efeitos da luz sobre o metabolismo do triptofano em melanócitos e melanomas, Ano de obtenção: 2017

Orientador: Profa. Dra. Ana Campa
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

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

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

Formação complementar

2018 - 2018 Curso de curta duração em Desenvolvimento de Métodos Indicativos de Estabilidade. (Carga horária: 17h).
United States Pharmacopeia - Brazil, USP, Brasil

2018 - 2018 Curso de curta duração em HPLC - Teoria Básica e Prática. (Carga horária: 40h).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

2012 - 2012 Extensão universitária em Vivência Profissional na Farmácia Escola. (Carga horária: 300h).

Atuação profissional

1. Universidade Cruzeiro do Sul - UNICSUL

Vínculo institucional

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

2. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

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

Áreas de atuação

1. Bioquímica
2. Fisiopatologia
3. Biologia Molecular

Idiomas

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

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

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. [doi](#) BRANQUINHO, M. S. F.; **SILVA, MAYSA B. B.**; SILVA, J. C.; SALES, M. C.; BARROS, S. B.; MARIA-ENGLER, S. S.; CAMPA, A. A 2D and 3D melanogenesis model with human primary cells induced by tyrosine. *Journal of Biological Methods*. , v.3, p.7 - , 2020.
2. [doi](#) BONEZI, VIVIAN; CATANEO, ALLAN H. D.; BRANQUINHO, MARYANA S. F.; **SILVA, MAYSA B. B.**; GONZALEZ-DIAS, PATRICIA; PEREIRA, SAMUEL S.; FERREIRA, LUÍS C. DE SOUZA; NAKAYA, HELDER I.; CAMPA, ANA; WOWK, PRYSCILLA F.; SILVEIRA, EDUARDO L. V. Flavivirus-Mediated B Cell Differentiation Into Antibody-Secreting Cells in Humans Is Associated With the Activation of the Tryptophan Metabolism. *Frontiers in Immunology*. [JCR](#), v.11, p.1 - , 2020.
3. [doi](#) GUTIERREZ, FERNANDA A.; SIERRA, ANA P.; SILVA, ELTON D.; SANTOS, VINICIUS C.; BENETTI, MARINO P.; **SILVA, MAYSA B. B.**; GONDIM, OLIVIA S.; OLIVEIRA, HELOISA H.; MOMESSO, CESAR M.; GORJÃO, RENATA; PESQUERO, JOÃO B.; CURY-BOAVENTURA, MARIA F. Genetic variation, inflammatory and muscle injury response in rugby players to different positions in the field. *GAZZETTA MEDICA ITALIANA. ARCHIVIO PER LE SCIENZE MEDICHE (TESTO STAMPATO)*. , v.179, p.1 - , 2020.
4. [doi](#) BORTOLON, JOSÉ RICARDO; MURATA, GILSON MASAHIRO; BORGES, LEANDRO; WEIMANN, ELEINE; **SILVA, MAYSA BRAGA BARROS**; DERMARGOS, ALEXANDRE; HATANAKA, ELAINE Recovery of Diabetic Rats After Physical Exhaustion: Kinetic Alterations in Muscle Inflammation and Muscle-Signaling Proteins to Atrophy and Hypertrophy. *Frontiers in Physiology*. [JCR](#), v.11, p.1 - , 2020.
5. [doi](#) BORGES, LEANDRO; PASSOS, MARIA E. P.; **SILVA, MAYSA B. B.**; SANTOS, VINICIUS C.; MOMESSO, CÉSAR M.; PITHON-CURI, TANIA C.; GORJÃO, RENATA; GRAY, STUART R.; LIMA, KAUÊ C. A.; DE FREITAS, PAULO B.; HATANAKA, ELAINE Dance Training Improves Cytokine Secretion and Viability of Neutrophils in Diabetic Patients. *MEDIATORS OF INFLAMMATION*. [JCR](#), v.2019, p.1 - 8, 2019.
6. [doi](#) BORGES, LEANDRO; DERMARGOS, ALEXANDRE; GRAY, STUART; **BARROS SILVA, MAYSA B.**; SANTOS, VINICIUS; PITHON-CURI, TANIA CRISTINA; GORJÃO, RENATA; HATANAKA, ELAINE Neutrophil Migration and Adhesion Molecule Expression after Acute High-Intensity Street Dance Exercise. *Journal of Immunology Research*. [JCR](#), v.2018, p.1 - 6, 2018.
7. [doi](#) WEIMANN, ELEINE; **SILVA, MAYSA BRAGA BARROS**; MURATA, GILSON MASAHIRO; BORTOLON, JOSE RICARDO; DERMARGOS, ALEXANDRE; CURI, RUI; HATANAKA, ELAINE Topical anti-inflammatory activity of palmitoleic acid improves wound healing. *PLoS One*. [JCR](#), v.13, p.e0205338 - , 2018.
8. [doi](#) SANTOS, VINICIUS CONEGLIAN; SIERRA, ANA PAULA RENNO; OLIVEIRA, RODRIGO; CAÇULA, KIM GUIMARÃES; MOMESSO, CÉSAR MIGUEL; SATO, FABIO TAKEO; **SILVA, MAYSA BRAGA BARROS**; OLIVEIRA, HELOISA HELENA; PASSOS, MARIA ELIZABETH PEREIRA; DE SOUZA, DIEGO RIBEIRO; GONDIM, OLIVIA SANTOS; BENETTI, MARINO; LEVADA-PIRES, ADRIANA CRISTINA; GHORAYEB, NABIL; KISS, MARIA AUGUSTA PEDUTI DAL MOLIN; GORJÃO, RENATA; PITHON-CURI, TÂNIA CRISTINA; CURY-BOAVENTURA, MARIA FERNANDA

Marathon Race Affects Neutrophil Surface Molecules: Role of Inflammatory Mediators. PLoS One. **JCR**, v.11, p.e0166687 -, 2016.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **BRAGA, M. B. S.**; BRANQUINHO, M. S. F.; CAMPA, A. UV-A radiation modulates tryptophan metabolism in melanocytes and melanomas In: XXII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF/USP, 2017, SÃO PAULO. **XXII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF/USP**, 2017.
2. BORGES, L. S.; PASSOS, M. E.; **BRAGA, M. B. S.**; CONEGLIAN, V.; MOMESSO, C. M.; PITHON-CURI, T. C.; GORJAO, R.; Hatanaka E. Efeito do treinamento com dança sobre o estado inflamatório de indivíduos diabéticos In: Semana Nacional de Ciência e Tecnologia, 2015, São Paulo. **Semana Nacional de Ciência e Tecnologia**, 2015.
3. Hatanaka E.; Weimann E.; **BRAGA, M. B. S.**; MURATA, G. M.; DERMARGOS, A. Effect of palmitoleic acid on the signaling mechanisms involved in the inflammatory phase of wound healing In: 40th FEBS Congress, 2015, Berlin. **40th FEBS Congress**, 2015.
4. Bachi, A.; SANTOS, V. C.; MOMESSO, C. M.; PASSOS, M. E.; **BRAGA, M. B. S.**; GUTIERREZ, F.; SIERRA, A. P.; CURY-BOAVENTURA, M. F.; GORJAO, R.; PITHON-CURI, T. C. Fish oil supplementation rich in DHA or EPA modulates the inflammatory response induced by a half-marathon In: 12th ISEI Symposium, 2015, Vienna. **12th ISEI Symposium**, 2015.
5. BELMIRO, B. D.; DERMARGOS, A.; Braga MO; **BRAGA, M. B. S.**; FRANCI, M.; Hatanaka E. Efeito da amilóide sérica A em queratinócitos In: XLIII Encontro de Iniciação Científica, 2014, São Paulo. **ENIC**. Andre, 2014.
6. CURY-BOAVENTURA, M. F.; SANTOS, V. C.; CACULA, K. G.; MOMESSO, C. M.; SATO, F. T.; **BRAGA, M. B. S.**; ALVES, H. H. O.; SANTOS, O. G.; SIERRA, A. P.; BENETTI, M.; KISS, M. A. P. D. M.; PITHON-CURI, T. C.; GORJAO, R. Effect of marathon race on adhesion molecules and apoptosis receptors of neutrophils. In: 19th Annual Congress of the European college of sport science, 2014, Amsterdã. **19th Annual Congress of the European college of sport science**, 2014.
7. Bachi, A.; CONEGLIAN, V.; PASSOS, M. E.; **BRAGA, M. B. S.**; GUTIERREZ, F.; CACULA, K.; MOMESSO, C. M.; SATO, F. T.; SIERRA, A. P.; BOAVENTURA, M. F. C.; GORJAO, R.; PITHON-CURI, T. C. Fish Oil supplementation rich in DHA reduces neutrophil apoptosis and cytokine concentration after a half-marathon. In: XXXIX Congresso of the brazilian society of immunology, 2014, Búzios-Rio de Janeiro. **XXXIX Congresso of the brazilian society of immunology**, 2014.
8. CACULA, K. G.; SANTOS, V. C.; MOMESSO, C. M.; SATO, F. T.; MURATA, G. M.; **BRAGA, M. B. S.**; ALVES, H. H. O.; PASSOS, M. E.; LEVADA-PIRES, A. C.; CURY-BOAVENTURA, M. F.; GORJAO, R.; PITHON-CURI, T. C. Modulation of neutrophil function by moderate aerobic exercise in eutrophic and overweight In: American College of Sports Medicine, 2014, Orlando. **American College of Sports Medicine**, 2014.
9. **BRAGA, M. B. S.**; MURATA, G. M.; Weimann E.; Braga MO; Curi, R.; Hatanaka E. Estudo da ação antimicrobiana dos ácidos oleico, linoleico, gama-linolênico, EPA, DHA e palmitoleico em feridas cutâneas In: XVII Encontro de Iniciação Científica, 2013, São Paulo. **ENIC**, 2013.
10. **BRAGA, M. B. S.**; MURATA, G. M.; Weimann E.; Braga MO; Curi, R.; Hatanaka E. Topical antimicrobial activity of EPA, DHA, oleic, linoleic, linolenic and palmitoleic acids in wounds In: XLII Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2013, Foz do Iguaçu. **The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society**, 2013.
11. Weimann E.; MURATA, G. M.; BORTOLON, J.R.; **BRAGA, M. B. S.**; Curi, R.; Hatanaka E. Topical macadamia oil and palmitoleic acid accelerate wound healing phases. In: 11th World Congress on Inflammation and XXXVIII Immuno, 2013, Natal. **11th World Congress on Inflammation and XXXVIII Immuno**, 2013.
12. **BRAGA, M. B. S.**; MURATA, G. M.; Weimann E.; Braga MO; Curi, R.; Hatanaka E. Topical antimicrobial activity of EPA, DHA, oleic, linoleic, linolenic and palmitoleic acids in wounds In: VIII Symposium on Lipids and Health, 2012, São Paulo. **VIII Symposium on Lipids and Health**, 2012.
13. **BRAGA, M. B. S.**; MURATA, G. M.; Weimann E.; Braga MO; Curi, R.; Hatanaka E. Topical antimicrobial activity of EPA, DHA, oleic, linoleic, linolenic and palmitoleic acids in wounds In: 6th Congress of the International Society of Nutrigenetics / Nutrigenomics, 2012, São Paulo. **6th Congress of the International Society of Nutrigenetics / Nutrigenomics**, 2012.
14. **BRAGA, M. B. S.**; MURATA, G. M.; Weimann E.; Braga MO; Curi, R.; Hatanaka E. Topical antimicrobial activity of oleic and linoleic acids in wounds In: 10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro. **International Congress on Cell Biolog**, 2012.
15. Weimann E.; MURATA, G. M.; BORTOLON, J.R.; **BRAGA, M. B. S.**; Curi, R.; Hatanaka E. Topical macadamia oil and palmitoleic acid accelerate wound healing phases. In: VIII Simpósio de Lipídeos e Saúde, 2012, São Paulo. **VIII Simpósio de Lipídeos e Saúde**, 2012.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **BRAGA, M. B. S.** **Metabolismo tumoral**, 2018. (Outra,Apresentação de Trabalho)
2. **SILVA, MAYSA BRAGA BARROS** **Metabolismo do triptofano em células da pele e no microambiente tumoral**, 2017. (Outra,Apresentação de Trabalho)
3. **SILVA, S. G.**; **BRAGA, M. B. S.**; CAMPA, A. **UV-A radiation increases expression of enzymes IDO and TDO in fibroblasts**, 2017. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
4. **BRAGA, M. B. S.**; BRANQUINHO, M. S. F.; CAMPA, A. **UV-A radiation modulates tryptophan metabolism in melanocytes and melanomas**, 2017. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
5. BORGES, L. S.; PASSOS, M. E.; **BRAGA, M. B. S.**; CONEGLIAN, V.; MOMESSO, C. M.; PITHON-CURI, T. C.; GORJAO, R.; Hatanaka E. **Efeito do treinamento com dança sobre o estado inflamatório de indivíduos diabéticos**, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
- 6.

- 🌟 **BRAGA, M. B. S.; MURATA, G. M.; Weimann E; Braga MO; Hatanaka E.**
Atividade antimicrobiana dos ácidos oleico, linoleico, palmítico, EPA, DHA e linolênico em
feridas cutâneas, 2013. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)
7. 🌟 **BRAGA, M. B. S.; MURATA, G. M.; Weimann E; Braga MO; Hatanaka E.**
Topical antimicrobial activity of EPA, DHA, oleic, linoleic, linolenic and palmitoleic acids in wounds,
2013. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
 8. 🌟 **BRAGA, M. B. S.; MURATA, G. M.; Weimann E; Braga MO; Hatanaka E.**
Topical antimicrobial activity of EPA, DHA, oleic, linoleic, linolenic and palmitoleic acids in wounds,
2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
 9. 🌟 **BRAGA, M. B. S.; MURATA, G. M.; Weimann E; Braga MO; Hatanaka E.**
Topical antimicrobial activity of EPA, DHA, oleic, linoleic, linolenic and palmitoleic acids in wounds,
2012. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
 10. 🌟 **BRAGA, M. B. S.; MURATA, G. M.; Weimann E; Braga MO; Hatanaka E.**
Topical antimicrobial activity of oleic and linoleic acids in wounds, 2012. (Congresso,Apresentação
de Trabalho)

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **BARROS SILVA, MAYSA B.**
V CURSO DE INVERNO EM FISIOPATOLOGIA E ANÁLISES CLÍNICAS, 2018. (Extensão, Curso de
curta duração ministrado)
2. **SILVA, MAYSA BRAGA BARROS**
IV CURSO DE INVERNO EM FISIOPATOLOGIA E ANÁLISES CLÍNICAS, 2017. (Extensão, Curso de
curta duração ministrado)
3. **BRAGA, M. B. S.**
XI Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular, 2016. (Extensão, Curso de curta duração
ministrado)

Educação e Popularização de C&T

Curso de curta duração ministrado

1. **BARROS SILVA, MAYSA B.**
V CURSO DE INVERNO EM FISIOPATOLOGIA E ANÁLISES CLÍNICAS, 2018. (Extensão, Curso de
curta duração ministrado)
2. **SILVA, MAYSA BRAGA BARROS**
IV CURSO DE INVERNO EM FISIOPATOLOGIA E ANÁLISES CLÍNICAS, 2017. (Extensão, Curso de
curta duração ministrado)
3. **BRAGA, M. B. S.**
XI Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular, 2016. (Extensão, Curso de curta duração
ministrado)

Demais produções técnicas

1. **BARROS SILVA, MAYSA B.**
V CURSO DE INVERNO EM FISIOPATOLOGIA E ANÁLISES CLÍNICAS, 2018. (Extensão, Curso de
curta duração ministrado)
2. **SILVA, MAYSA BRAGA BARROS**
IV CURSO DE INVERNO EM FISIOPATOLOGIA E ANÁLISES CLÍNICAS, 2017. (Extensão, Curso de
curta duração ministrado)
3. **BRAGA, M. B. S.**
XI Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular, 2016. (Extensão, Curso de curta duração
ministrado)

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. **IV ABCF Congress, 2018. (Congresso)**
 .
2. Conferencista no(a) **IV Curso de Inverno em Fisiopatologia e Análises Clínicas, 2017. (Outra)**
 Metabolismo do triptofano em células da pele e no microambiente tumoral.
3. **VIII Workshop on Melanoma Models, 2017. (Simpósio)**
 .
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2017. (Congresso)**
 UV-A radiation modulates tryptophan metabolism in melanocytes and melanomas.
5. **XXIX Semana Interna de Prevenção de Acidentes de Trabalho - SIPAT, 2017. (Congresso)**
 .
6. **II International symposium on pathophysiology and toxicology and VII Simpósio de pós-graduação em Análises Clínicas - SIMPAC, 2016. (Simpósio)**
 .

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

Organização de evento

1. BRAGA, M. B. S.
VIII Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas - SIMPAC and III International symposium on Pathophysiology and Toxicology - ISPAT, 2018. (Congresso, Organização de evento)

Bancas

Bancas

Participação em banca de comissões julgadoras

Outra

1. VIII Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas - SIMPAC and III International symposium on Pathophysiology and Toxicology - ISPAT, 2018
Universidade de São Paulo
2. II International symposium on pathophysiology and toxicology and VII Simpósio de pós-graduação em análises clínicas - SIMPAC, 2016
Universidade de São Paulo

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico	8
Trabalhos publicados em anais de eventos	15
Apresentações de trabalhos (Conferência ou palestra)	1
Apresentações de trabalhos (Congresso)	6
Apresentações de trabalhos (Simpósio)	1
Apresentações de trabalhos (Outra)	2

Produção técnica

Curso de curta duração ministrado (extensão)	3
--	---

Eventos

Participações em eventos (congresso)	8
Participações em eventos (simpósio)	7
Participações em eventos (outra)	2
Organização de evento (congresso)	1
Participação em banca de comissões julgadoras (outra)	2

Outras informações relevantes

- 1 Membro na Comissão Coordenadora do Programa de Farmácia - Representante dos alunos de Pós-Graduação do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP (Julho/2017 - Julho/2018).
Monitoria durante a Pós-Graduação: Disciplina de Fisiopatologia, no curso de Farmácia da FCF-USP (Fevereiro/2018 - Julho/2018).

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 06/04/2021 às 17:11:08.