



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA

HELLEN JOYCE DE SOUSA PEREIRA DOS SANTOS

RA: 617150089

**Análise da expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase e de suas vias no
processo de invasão de células de câncer de bexiga**

SÃO PAULO-SP

2019



HELLEN JOYCE DE SOUSA PEREIRA DOS SANTOS

RA: 617150089

**Análise da expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase e de suas vias no
processo de invasão de células de câncer de bexiga**

Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Medicina.

Orientador: Prof. Humberto Dellê

SÃO PAULO - SP

2019

Santos, Hellen Joyce de Sousa Pereira dos.

Análise da expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase e de suas vias no processo de invasão de células de câncer de bexiga. / Hellen Joyce de Sousa Pereira dos Santos. 2019.

46 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2019.

Orientador (a): Prof. Dr. Humberto Dellê.

1. Câncer de bexiga. 2. Indoleamina 2,3-dioxigenase. 3. Interferon-gama (INF γ). 4. Ressecção transuretral.
- I. Dellê, Humberto. II. Título

CDU 616



São Paulo 30 de outubro de 2019

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: **HELLEN JOYCE DE SOUSA PEREIRA DOS SANTOS**

Título da dissertação: **ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA INDOLEAMINA 2,3 – DIOXIGENASE E DE SUAS VIAS NO PROCESSO DE INVASÃO DE CÉLULAS DE CÂNCER DE BEXIGA**

Presidente: PROF. DR. HUMBERTO DELLÊ

Membro: PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER

Membro: PROF. DR. TIAGO GÓSS DOS SANTOS

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em especial à minha filha, Maria Eduarda, e ao meu esposo, Junior, que juntos estiveram comigo nas decisões e no caminho que trilhei e que se tornaram pilares em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me guiado e me dado forças para continuar e não desistir perante as dificuldades encontradas no decorrer do curso.

Agradeço à Universidade Nove de Julho – UNINOVE pela estrutura física e intelectual fornecidas para o início e continuidade dos trabalhos desenvolvidos em conjunto assim como os recursos fornecidos para a conclusão deste degrau que inicia minha vida acadêmica.

Ao meu orientador, professor Humberto Dellê, por sua dedicação e compromisso em ensinar e me instruir desde o meu primeiro contato com a Universidade.

Agradeço à minha filha, Maria Eduarda, que me forneceu incentivo em todos os sentidos para seguir em frente e concluir cada etapa com o equilíbrio e força necessários desde o primeiro dia que senti o lampejo pela pesquisa e docência.

Agradeço ao meuesposo, Junior, por todo o amor, compreensão e apoio mútuo para superar cada dificuldade e aprender com elas.

Agradeço grandemente aos companheiros e colaboradores do grupo de pesquisa, por seu apoio e grande auxílio técnico, intelectual e pessoal, Luiz Henrique, Stephanie, Alex, Lucas, Letícia e todos os demais que contribuíram para a execução deste trabalho

“Não pretendemos que as coisas mudem se sempre fazemos o mesmo. A crise é a melhor benção que pode ocorrer com as pessoas e países, porque a crise traz progressos. A criatividade nasce da angústia, como o dia nasce da noite escura. É na crise que nascem as invenções, os descobrimentos e as grandes estratégias. Quem supera a crise, supera a si mesmo sem ficar “superado”. Quem atribui à crise seus fracassos e penúrias, violenta seu próprio talento e respeita mais os problemas do que as soluções. A verdadeira crise é a crise da incompetência... Sem crise não há desafios; sem desafios, a vida é uma rotina, uma lenta agonia. Sem crise não há mérito. É na crise que se aflora o melhor de cada um...”.

- Albert Einstein

LISTA DE ABREVIATURAS

AHR – *Aryl hydrocarbon receptor*

BCG - *Bacilo de Calmette-Guérin*

cDNA – DNA complementar

CB – Câncer de bexiga

CHOP - C/EBP homologous protein

DNA - Ácido desoxirribonucleico

GCN2 – general control non derepressible 2

IC – *Invasive cells*

IDO1 – Indoleamina 2,3 dioxigenase.

IFN – Interferon

INF γ – Interferon Gama

Kyn – Quinurenina

MT – 1-metil-D-Triptofano

mTor - mechanistic target of rapamycin

NIC - *Non invasive cells*

PBS – Tampão Fosfato-Salino

PCR – Reação de Cadeia de Polimerase

qRT-PCR – quantitativo em tempo real

RNA – Ácido Ribonucleico

SFB – Soro Fetal Bovino

TEM – Transição Epitélio Mensenquimal

TGF- β – Transforming growth factor beta

Lista de Figuras

Figura 1- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.....	12
Figura 2- Distribuição dos novos casos e de morte por câncer para os principais tipos de câncer.....	13
Figura 3- Estimativas de novos casos de câncer de bexiga.....	14
Figura 4- Estágios do câncer de bexiga humana.....	15
Figura 5- Vias de ativação da IDO1.....	17
Figura 6- Esquema método Matrigel/Transwell para separação de células NIC e IC.....	24
Figura 7- Imagens do experimento de Scratch-wound.....	25
Figura 8- Comparação entre as linhagens celulares de carcinoma da bexiga RT4 e T24 para expressão de IDO1.....	31
Figura 9- Análise de expressão para IDO1 em células T24 não invasivas (NIC) e invasivas (IC).....	32
Figura 10- Análise de expressão para CHOP em células T24 não invasivas (NIC) e invasivas (IC)	33
Figura 11- Análise de expressão para CYP1A1 em células T24 não invasivas (NIC) e invasivas (IC).....	33
Figura 12- Expressão de IDO1 em células T24 estimuladas com INF- γ	34
Figura 13- Efeito da inibição da IDO1 pelo siRNA na invasão celular.....	35
Figura 14- Efeito da inibição da IDO1 pelo inibidor químico INCB024360 na invasão celular.....	35
Figura 15- . Modelos ortotópicos e ectópicos de CB foram realizados para avaliar a imunocoloração de IDO1.....	37

Lista de Tabelas

Tabela 1- Primers utilizados para RT-PCR em tempo real.....	27
--	----

RESUMO

O câncer é responsável por uma a cada seis mortes no mundo. Dentre os mais comuns em homens, está o câncer de bexiga (CB). A forma mais comum de CB é a não-músculo invasiva, sendo que metade desses casos tem recidiva após tratamento convencional e 30% evolui para a forma músculo invasiva, levando à metástase e à morte. A indoleamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO1) é uma enzima atualmente reconhecida como imunomoduladora desde que seu papel em proteger o tecido embrionário contra o sistema imune materno foi demonstrado. A IDO tem sido estudada em diversos tipos de câncer, sendo apontada como chave no escape tumoral à vigilância imunológica hospedeira. Contudo, há evidências de que a IDO participe de fenômenos não-imunes, sendo um deles a invasão tumoral. Em estudo prévio, demonstramos que a expressão da IDO1 relaciona-se com o fenômeno de transição epitélio-mesenquimal, um fenômeno celular importante na invasão tumoral. Porém, ainda não se sabe se a expressão de IDO é constitutiva em CB ou se ela é influenciável pelo microambiente, sendo estratégica na evolução tumoral. O objetivo do estudo foi verificar se a expressão de IDO1 é constitutiva em linhagens estabelecidas de CB e se sofre alteração durante o processo de invasão tumoral. Adicionalmente, verificar se suas vias de ativação são alteradas no mesmo processo. O estudo foi constituído por uma fase *in vitro* e uma fase *in vivo*. Na fase *in vitro*, a principal célula utilizada foi a T24, uma linhagem humana de carcinoma de bexiga músculo-invasivo. A expressão de IDO foi analisada nesta célula por PCR em tempo real, sendo comparada com células RT4, uma linhagem de carcinoma humano não-músculo invasivo. Já para analisar o processo de invasão, as células T24 foram semeadas em sistema Matrigel/Transwell por 24 horas e classificadas como células invasivas (IC) e células não-invasivas (NIC). Analisou-se a expressão de IDO e de genes marcadores da ativação de suas vias GCN2 e AHR entre essas duas subpopulações, tanto logo após a invasão, como depois de subcultivo. Para avaliar a influência da IDO na invasão, células T24 foram induzidas com INF-gama, um potente indutor da IDO, e incubadas com RNA de interferência para IDO ou inibidor químico, a fim de inibir sua expressão e atividade, respectivamente. Na fase *in vivo*, utilizou-se os modelos murinos ortotópico e ectópico de CB, a fim de avaliar a expressão de IDO por imunohistoquímica. Os resultados demonstraram que as células T24 expressam mais IDO quando comparadas com as RT4. Nos resultados de comparação entre NIC e IC, houve uma diminuição na expressão da IDO1 logo após a migração, porém esta diferença foi perdida quando as células foram subcultivadas por 18 dias. Em relação a capacidade de invasão, quando as células T24 foram tratadas com INF γ , houve um aumento significativo na expressão de IDO1, reduzindo significativamente a taxa de invasão quando comparada a células não tratadas. O mesmo resultado referente a taxa de invasão foi demonstrado quando usado o siIDO, ou seja, a inibição traducional da IDO inibiu significativamente a invasão celular no sistema Matrigel/Transwell. Na fase *in vivo*, a expressão de IDO1 foi predominante baixa em células tumorais em áreas de invasão da musculatura, sendo que as células mais afastadas do fronte (periferia) expressavam mais IDO1. Nossos resultados corroboram outros estudos, levantando a hipótese de que as células de CB expressam diferentes níveis de IDO1 e que isso pode influenciar o fenótipo celular e intensificar a invasividade tecidual.

Palavras-chave: Câncer de bexiga, Indoleamina 2,3-dioxigenase, Interferon-gama (INF γ), Ressecção transuretral.

ABSTRACT

Cancer accounts for one in six deaths world wide. Among the most common in men is bladder cancer (CB). The most common form of CB is non invasive muscle, with half of these cases relapsing after conventional treatment and a significant portion evolving to invasive muscle form, leading to metastasis and death. Indolamine 2,3-dioxigenase 1 (IDO1) is an enzyme currently recognized as an immunomodulator since its role in protecting embryonic tissue against the maternal immune system has been demonstrated. IDO has been studied in several types of cancer and has been identified as a key in tumor escape to host immune surveillance. However, there is evidence that IDO participates in non-immune phenomena, one of them being tumor invasion. In a previous study, we demonstrated that the expression of IDO1 is related to the epithelium-mesenchymal transition phenomenon, an important cellular phenomenon in tumor invasion. However, it is not yet know the expression of IDO is constitutive in CB or if it is influenced by the microenvironment, being strategic in the tumor evolution. The aim of the study was to verify if the expression of IDO1 is constitutive in established CB strains and if it changes during the tumor invasion process. Additionally, check if their activation pathways are changed in the same process. The study consisted of an in vitro phase and an in vivo phase. In the in vitro phase, the main cell used was T24, a human strain of muscle-invasive bladder carcinoma. IDO expression was analyzed in this cell by real-time PCR and compared with RT4 cells, a non-invasive human muscle carcinoma strain. To analyze the invasion process, T24 cells were seeded in Matrigel/transwell system for 24 hours and classified as invasive cells (IC) and non invasive cells (NIC). The expression of IDO and marker genes of the activation of their GCN2 and AHR pathways between these two subpopulations, both after invasion and after subculture, was analyzed. To assess the influence of IDO on invasion, T24 cells were induced with INF-gamma, a potent IDO inducer, and incubated with interfering RNA for IDO or chemical inhibitor to inhibit their expression and activity, respectively. In the in vivo phase, the orthotopic and ectopic murine CB models were used to evaluate the expression of IDO by immunohistochemistry. The results showed that T24 cells express more IDO when compared to RT4. In the comparison results between NIC and IC, there was a decrease in IDO1 expression soon after migration, but it was lost when the cells were subcultured for 18 days. Regarding invasion capacity, when cells were treated with INF γ , there was a significant increase in IDO1 expression in T24 cells, significantly reducing the invasion rate when compared to untreated cells. The same result regarding invasion rate was demonstrated when using siIDO, translational inhibition of IDO significantly inhibited cell invasion in the Matrigel/Transwell system. In the in vivo phase, IDO1 expression was predominant low in tumor cells in areas of invasion of the muscles, and the cells farther from the forehead (periphery) expressed more IDO1. Our results corroborate other studies, raising the hypothesis that CB cells express different levels of IDO1 and that this on the T24 cell phenotype by intensifying tissue invasive.

Keywords: Bladder cancer, Indolamine 2,3-dioxigenase, Interferon-gamma, Transurethral resection.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Câncer de bexiga (CB)	13
1.2 Indoleamina 2,3–dioxigenase (IDO1)	15
1.3 IDO1 no câncer	17
1.4 IDO1 em câncer de bexiga (CB)	19
2 OBJETIVO	21
2.1 Objetivos Específicos.....	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Cultura de células	22
3.2 Sistema Matrigel/Transwell como modelo in vitro de invasão.....	22
3.3 Tratamento com interferon-gama (INF-gama) e RNA de interferência para IDO.....	24
3.4 Scratch-wound: análise de capacidade de migração.....	25
3.5 PCR em Tempo Real.....	26
3.5a Extração de RNA e transcrição reversa	26
3.5b PCR em tempo real.....	26
3.6 Animais.....	28
3.7 Inoculação transuretral de células MB49	28
3.8 Inoculação subcutânea de células MB49.....	29
3.9 Análise Imunohistoquímica	29
3.10 Análise estatística	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Expressão de IDO em linhagens de CB	31
4.2 Expressão de IDO e marcadores das vias GCN2 e AHR em modelo in vitro de invasão	31
4.3 Indução da expressão de IDO na invasão tumoral	34
4.4 Inibição da expressão de IDO na invasão tumoral	35
4.5 Inibição da atividade da IDO na invasão tumoral.....	35
4.6 Expressão de IDO1 em modelo in vivo de invasão	36
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	42
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

O câncer é responsável por uma a cada seis mortes no mundo. Por ano, mais de 14 milhões de pessoas desenvolvem câncer, e até 2030 a estimativa é que esse número possa subir para mais de 21 milhões de pessoas (1). A Organização Mundial de Saúde (OMS) indica que, por ano, cerca de 8.8 milhões de pessoas morrem de câncer e que destas, o maior número refere-se a países de baixa e média rendas (1).

No Brasil, segundo informações do Instituto Nacional do Câncer, estima-se a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer para cada ano em 2018 e 2019. Destes, os principais no homem são os cânceres de próstata, pulmão, intestino, estômago e cavidade oral (1).

Já nas mulheres, os cânceres de mama, intestino, colo do útero, pulmão e tireoide são mais comuns (1). Para o câncer de bexiga (CB), estima-se 6.690 casos novos em homens e 2.790 novos casos em mulheres para cada ano, correspondendo a um risco estimado de 6,43 casos novos a cada 100 mil homens, ocupando, assim, a sétima posição, conforme Figura 1 (1).

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma. Retirado de INCA, 2018 (1).

Em relação aos Estados Unidos, o câncer é a segunda principal causa de morte (2). De acordo com o levantamento do *National Cancer Institute's Surveillance Epidemiology and End Results* (2018), cerca de 1,7 milhão de pessoas seriam diagnosticadas com câncer em 2018 ao redor do mundo, sendo o diagnóstico mais comum o câncer de mama, com aproximadamente 266.120 mulheres e 2.550 homens, seguido do câncer de pulmão e brônquios, com uma estimativa de 234.030 novos casos, como mostra a Figura 2 (3).

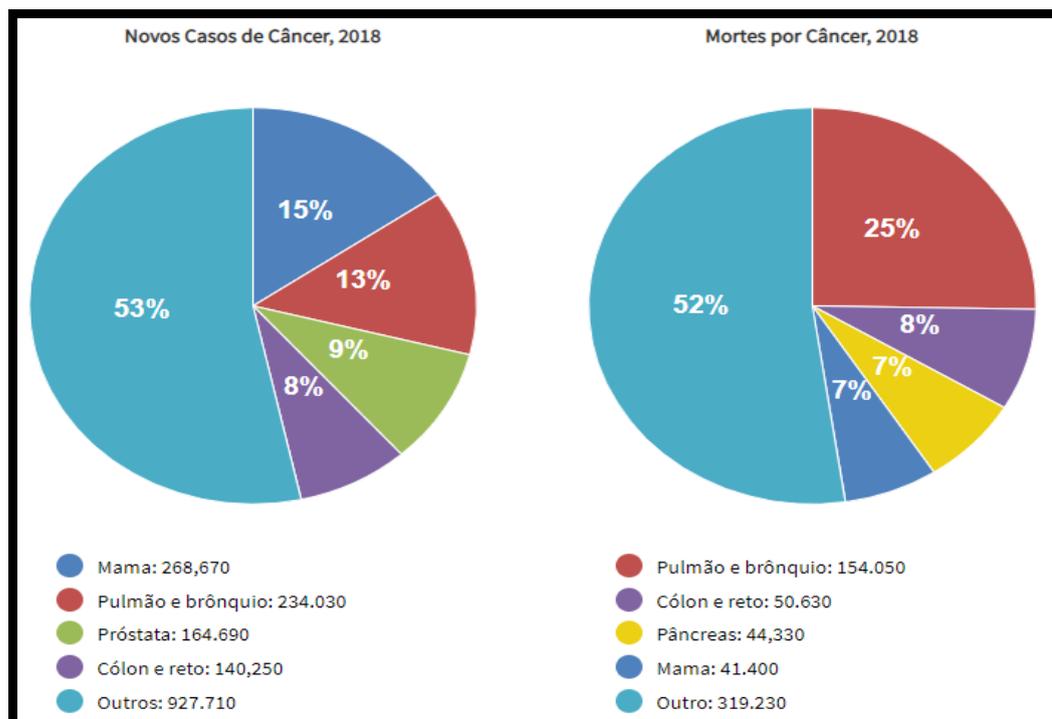


Figura 2. Distribuição dos novos casos e de morte por câncer para os principais tipos de câncer. Adaptado de *National Cancer Institute*, 2018 (3).

1.1 Câncer de bexiga (CB)

O CB é classificado como a segunda malignidade mais comum do trato geniturinário nos Estados Unidos, ficando atrás apenas do câncer de próstata, com aproximadamente 81.000 novos casos e 17.000 mortes a cada ano a partir de 2018, representando 4,7% de casos, como mostra a Figura 3 (3).



Figura 3. Em 2018, estima-se que haverá 81.190 novos casos de CB e estima-se que 17.240 pessoas morrerão dessa doença nos Estados Unidos. Fonte: *National Cancer Institute*, 2018 (3).

O CB é uma neoplasia maligna com um tratamento considerado de alto custo, devido, principalmente, às altas taxas de recorrência, que exigem acompanhamento ao longo da vida, com vários procedimentos cirúrgicos (4).

Burger e colaboradores (2013), em seus estudos, associam fatores de risco genéticos, bem como comportamentais e nutricionais, tais como, tabagismo, ingestão de água contaminada com arsênio e exposições ocupacionais, a respeito do câncer de bexiga (CB). Desses riscos, o mais importante é o tabagismo, que sozinho associa-se com cerca de 50% dos tumores (5).

A maioria dos pacientes (> 70%) apresenta CB não-músculo invasivo (NMI) ao diagnóstico. Para prevenção de recorrência ou progressão da doença, em pacientes com risco intermediário e alto risco de recidiva, o tratamento padrão consiste na ressecção transuretral e em instilações intravesicais com o *bacillus Calmette-Guérin* (BCG), no entanto, 20% a 30% dos pacientes tratados com BCG apresentam recidivas, podendo progredir para a forma músculo invasiva (MI), onde ressecções repetitivas ou cistectomia radical se fazem necessárias, considerando ainda, a alta probabilidade de metástase (4-5).

A Figura 4 mostra a classificação do CB, de acordo com a sua localização na bexiga humana. Os tumores NMI incluem, por definição, tumores Ta (carcinoma

papilífero não-invasivo), T1 (tumor que invade o tecido conjuntivo subepitelial) ou Tis (*carcinoma in situ*).

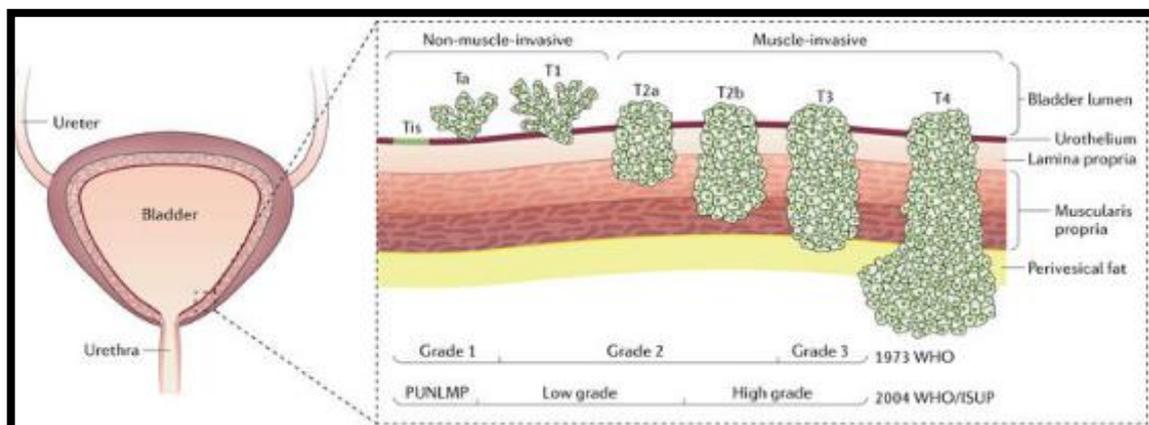


Figura 4. Estágios do CB humana. Figura extraída de artigo Nature Reviews Disease Primers. FONTE: Nature, 2017 (6).

Entretanto, quase metade destes tumores recorre após ressecção, sendo que uma parcela significativa irá progredir para a forma invasiva da muscular (T2, tumor que invade o músculo; T3, tumor que invade tecido perivesical; e T4, tumor que invade estruturas como próstata, útero, vagina, parede pélvica ou abdominal). Conforme, a disseminação em linfonodos ou metástase, que obedecem a Classificação de Tumores Malignos (TNM) (4).

1.2 Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO1)

A IDO1 tem sido reconhecida como molécula imunomoduladora desde que Munn e colaboradores demonstraram em 1998 sua expressão na interface materno-fetal e sua função em proteger o embrião contra o sistema imune materno (7).

A IDO1 foi descrita pela primeira vez na década de 1960, ao ser identificada em intestino de coelho (8). Esta enzima apresentou um importante papel quando relacionada à proteção do organismo, pois tornava o microambiente desfavorável para o crescimento microbiano, devido a degradação local do aminoácido essencial triptofano, impedindo a invasão e disseminação de microparasitas (9).

Nos macrófagos, a produção de IDO1 apresenta claramente o papel da enzima atuando contra estes microrganismos (9). Para a proteção embrionária, a explicação seguiria o mesmo sistema mencionado acima, onde a deficiência de triptofano induz a neutralização das células *Natural Killer* e linfócitos T alorreativos a

antígenos paternos, promovendo, nessas células, apoptose e anergia (7). Contudo, estudos mais recentes demonstram que a imunomodulação conferida pela IDO1 não limita-se apenas à depleção local de triptofano, mas também pela formação de catabólitos deste aminoácido chamados coletivamente de derivados da quinurenina, os quais contribuem para a anergia e apoptose das células imunes efectoras (10).

Resumidamente, a degradação local de triptofano e a geração dos catabólitos da quinurenina acionam vias de sinalização que culminam na modulação imunológica local e também no controle de processos celulares.

Quando a depleção de triptofano ocorre em virtude da ação da IDO1, duas vias de detecção de falta de aminoácido são acionadas, a via da mTOR e a via da GCN2. A mTOR (do inglês *mammalian target of rapamycin kinase*) é uma enzima quinase que forma 2 complexos diferentes: o mTORC1 e o mTORC2. Estes complexos estão envolvidos em mecanismos fundamentais para a manutenção da homeostasia tecidual. Dentre eles, o controle da decisão pelo crescimento celular ou pela autofagia (11). A outra via acionada pela IDO1 é a quinase GCN2 (do inglês *General Control Non-Derepressible 2*). A GCN2, quando ativada pela depleção de triptofano, dispara vias de sinalização que podem controlar o ciclo celular, apoptose e diferenciação celular, a depender do tipo de célula (12-14). Uma forma de avaliar a ativação da via GCN2 é por meio da expressão da CHOP (do inglês *C/EBP homologous protein*), um fator de transcrição que controla a expressão de genes envolvidos na sobrevivência/apoptose das células.

A terceira via mediada pela IDO1 é o acionamento do receptor de hidrocarboneto de arila (AHR, do inglês *aryl hydrocarbon receptor*). O AHR é um fator de transcrição que transloca-se para o núcleo celular quando ligado por ligantes xenobióticos. A relação entre IDO1 e AHR ocorre pela quinurenina e seus derivados, os quais acionam a AHR (15). Uma forma de avaliar o acionamento da AHR é verificando a expressão de citocromo P1A1 (CYP1A1). Por ser apontado como um mediador da sobrevivência e motilidade de células de glioblastoma (16), é provável que a via AHR esteja envolvida na diferenciação celular e estabelecimento de fenótipos mais resistentes. Em células de câncer de pulmão, o AHR está envolvido no processo de transição epitélio mesenquimal (TEM) (17). Além disso, a invasividade de células de carcinoma renal é controlada pelo AHR (18). Camundongos transgênicos para ativação permanente de AHR desenvolvem tumor de estômago espontaneamente (19). Desta maneira, a IDO1 não teria um efeito

apenas sobre o sistema imunológico agindo via AHR, mas também efeitos independentes do sistema imune, ou seja, efeitos diretos sobre a promoção de tumorigênese e disseminação tumoral. Em câncer de bexiga esses efeitos não foram explorados até o momento.

A Figura 5 demonstra resumidamente os acontecimentos de acordo com cada via ativada pela IDO1, onde a queda da concentração de triptofano no microambiente inibe a via mTOR sustentada por aminoácidos e deflagra a via de estresse celular GCN2. Já o aumento de catabólitos (derivados da quinurenina) ativa o AHR, com consequente modulação gênica.

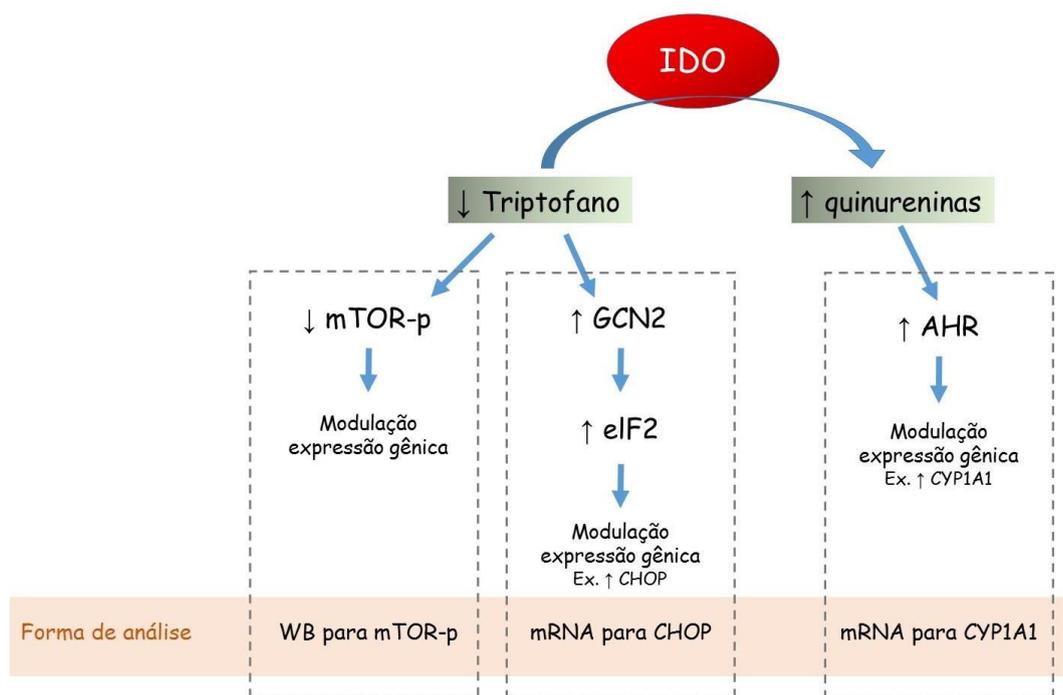


Figura 5. Vias de ativação da IDO1

1.3 IDO1 no câncer

Estudos demonstraram que alguns tipos de câncer expressam IDO1 e apontaram a enzima como um fator protetor ao câncer, especialmente por garantir um “escape imunológico”, ou seja, aquisição de tolerância imunológica ao tecido neoplásico (20-21).

Em experimento com camundongos pré-imunizados, a expressão de IDO1 protegeu células neoplásicas infundidas, e quando inibida quimicamente com metil-triptofano (MT), esta proteção foi perdida (21). Estudo com camundongo nocauteado para o gene Bin1, um gene supressor de tumor, demonstrou que a expressão de IDO1 é aumentada no tumor destes animais, sugerindo que a expressão de IDO1 em células neoplásicas estaria sob o controle deste gene (22). A inibição da IDO1 potencializa o efeito de quimioterápicos contra estes tumores (22). Este efeito protetor da IDO1 em tumores é perdido quando se trata de camundongos nude (imunodeficientes) ou com depleção de células CD4+ e CD8+, demonstrando que há um fator protetor relacionado à imunomodulação (22).

Com base em estudos clínicos, a expressão de IDO1 *“in situ”* correlaciona-se com progressão de câncer endometrial, funcionando como marcador para pior prognóstico clínico (23). Na mesma linha de estudo, a expressão de IDO1 correlaciona-se com diminuição da sobrevida e pior prognóstico para portadores de câncer ovariano (24). Além disso, a expressão de IDO1 está presente também em câncer colorretal e está relacionada à metástase hepática com diminuição de linfócitos T (25). Embora efeito semelhante tenha sido descrito em carcinoma hepatocelular (26), estudo com cocultura de células mononucleares de sangue periférico e células de carcinoma hepatocelular demonstrou que a IDO1 é importante para a atividade imune anticâncer (27).

Este efeito contraditório foi também demonstrado em carcinoma renal, onde detectou-se a expressão de IDO1 em células endoteliais de vasos tumorais, correlacionando-se com maior sobrevida dos pacientes (28). A IDO1 parece exercer efeitos paradoxos dependentes do tipo de tecido neoplásico.

Com relação ao sistema geniturinário masculino, estudo envolvendo pacientes com câncer de próstata e com hiperplasia demonstrou que a expressão de IDO1 é significativamente maior nos tumores em relação ao tecido hiperplásico, sendo apontada como atraente marcador para este tipo de neoplasia (29).

A IDO1 tem sido considerada um alvo interessante contra o câncer, fazendo com que estudos clínicos fossem iniciados. Atualmente, novas estratégias para o bloqueio da IDO1 têm sido desenvolvidas, inclusive muitas delas já sendo testadas em estudos clínicos (30).

1.4 IDO1 em câncer de bexiga (CB)

Embora a IDO1 venha sendo estudada em diversos tipos de câncer, pouco se sabe sobre seu papel no CB. É curioso o fato da IDO1 ter sido estudada em um modelo celular de CB (T24) em meados da década de 1980 (31) e nessa época não ter sido implicada na fisiopatologia da doença. O primeiro estudo que identificou a expressão de IDO1 em tumor de bexiga foi publicado em 2003, um estudo que explorou a expressão da enzima em diversos tipos de tumor (21). Mais de 10 anos depois, um estudo com biópsias de CB demonstrou que a expressão de IDO1 é maior em tumores músculo invasivos do que em não-músculo invasivos e correlaciona-se com progressão tumoral, sendo que a frequência de positividade imunohistoquímica para IDO1 foi maior em tumores de grau 3 do que em grau 1 e 2 (32). Hudolin e colaboradores (2017) demonstraram que a expressão de IDO1 é maior em células de câncer de bexiga não-músculo invasiva quando comparadas às células de tecido vesical normal e que tumores T1 expressam mais IDO1 do que tumores T0 (33). Finalmente, no estudo de Tsai e colaboradores foi demonstrado que pacientes portadores de carcinoma urotelial eliminam produtos da quinurenina pela urina e que tumores com forte marcação imunohistoquímica para IDO1 estão associados a maior incidência de progressão (34). No mesmo estudo, os pesquisadores realizaram análise “*in silico*” de séries de análise transcriptômica publicadas no NCBI (do inglês *National Center of Biotechnology Information*), demonstrando que a expressão elevada de IDO1 em tumores de bexiga correlaciona-se com menor sobrevida livre da doença e correlaciona-se positivamente com marcadores mesenquimais (ZEB2, vimentina, metaloproteinase-9, fibronectina e Slug), e que a IDO1 tem papel chave na indução da transição epitélio mesenquimal em célula de câncer de bexiga por meio de miRNAs que controlam a expressão de ZEB2 (34).

Em estudo realizado em nosso laboratório com biópsias de CB, observamos que a IDO1 correlaciona-se com grau e o estadiamento tumoral, corroborando os estudos comentados acima (36). O que parece comum entre os estudos é que mesmo havendo diferença estatística, a variabilidade na expressão de IDO1 é alta. Essa variabilidade é encontrada também em outros tipos de câncer. O perfil de marcação imunohistoquímica é heterogêneo, ou seja, há espécimes com quase todas as células neoplásicas marcadas, enquanto em outras a marcação é mais forte em uma ou outra célula. Isso tem dificultado a avaliação quantitativa da enzima. Não se

sabe se esse perfil é um reflexo da instabilidade genômica, com ativação do gene da IDO1 em subclones, ou se a expressão de IDO1 é constitutiva nas células de CB, porém sofre variações dependendo do estímulo e/ou do microambiente. Em vista do exposto, visamos a possibilidade da IDO estar envolvida no processo de invasão celular.

2 OBJETIVO

O objetivo do estudo foi verificar se a expressão de IDO1 é constitutiva em linhagens estabelecidas de CB e se sofre alteração durante o processo de invasão tumoral.

2.1 Objetivos Específicos

- Verificar se a expressão de IDO1 em linhagens estabelecidas de CB é constitutiva (*in vitro*);
- Verificar a expressão de IDO1 e de genes ativados pelas vias GCN2 e AHR em modelo *in vitro*;
- Verificar se a indução e a inibição da IDO1 interferem a invasão tumoral;
- Verificar a expressão de IDO1 em modelo *in vivo* de invasão tumoral, a fim de comparar com o modelo *in vitro*;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

Para o presente estudo foram utilizadas células humanas RT4 e T24 de carcinoma de bexiga, adquiridas comercialmente do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sendo representativas de não-músculo invasiva (grau 1) e músculo invasiva (grau 3), respectivamente (35). Ressaltamos que as células RT4 foram utilizadas no experimento afim de comparação na expressão deIDO com as T24 e que não foi possível experimentos em sistema Matrigel/transwell com as mesmas, pois estas células têm baixo grau de invasividade, não ultrapassando assim o matrigel, conforme resultados obtidos em nossos testes. Foram cultivadas e mantidas em cultura com meio RPMI 1640 (Vitrocell, Campinas, SP), suplementado com soro fetal bovino 10% (SFB) e penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), a 37 °C com 5% de CO₂. Células murinas MB49, representativas de CB músculo invasivo, também foram usadas, porém destinadas ao modelo *in vivo* (ver adiante).

3.2 Sistema Matrigel/Transwell como modelo *in vitro* de invasão

O sistema Matrigel/Transwell, ilustrado na Figura 6, foi usado no estudo com a finalidade de prover a análise de invasão celular (células T24), tanto para avaliar a capacidade invasiva da célula sob diferentes condições, como também para a separação de células com baixo e alto potencial invasivo. Denominamos células não-invasivas (NIC, do inglês *non invasive cells*), as células que permaneceram na superfície do Matrigel após 24h, e invasivas (IC, do inglês *invasive cells*), as células que alcançaram o Transwell após 24h de incubação.

Mais detalhadamente, após atingirem confluência de 80% em garrafa de 75cm², as células T24 foram submetidas à cariciamento de soro por 24h, sendo posteriormente tripsinizadas (cinco minutos a 37°C com solução de tripsina 0,25%, Vitrocell, Campinas, SP).

Após tripsinizar sem a utilização de SFB, as células foram semeadas em no sistema Matrigel/Transwell em placa de 24 poços (Corning, Nova York, EUA). O sistema foi preparado previamente adicionando-se 100µL de Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA, EUA) diluído 1:5 em RPMI sem SFB em cada Transwell

(código 3422, 6,5 mm de diâmetro, com poros de 8 µm de diâmetro, Corning, Nova York, EUA). Após 30 minutos em estufa a 37°C, 5×10^4 células contidas em 100 µL de RPMI sem SFB foram semeadas sobre o sistema (por Transwell). Em cada poço da placa, foi colocado 0,5 mL de RPMI com SFB 20%, o qual manteve sempre contato com o Transwell por baixo do sistema. O período de incubação de 24 horas foi estabelecido afim de coletar as células que obtiveram um maior grau de invasividade. Todas as células foram coletadas, sendo direcionadas para uma das análises:

- Separação de NIC de IC. Para a separação das células, colheu-se o meio RPMI com 20% SFB do poço que banhava o Transwell, lavou-se uma vez com PBS e acrescentou-se solução de tripsina 0,25% (Vitrocell, Campinas, SP). Após incubação a 37°C por 6 minutos, as células IC foram centrifugadas a 120 G por 5 minutos, sendo imediatamente congeladas para extração de RNA ou subcultivadas em garrafa de 75 cm² em meio RPMI com 10% SFB por 2 semanas. O tempo de subcultivo foi estabelecido devido a necessidade de aumentar o número de células que migraram no transwell. As células que permaneceram sobre o Matrigel foram lavadas com PBS e centrifugadas a 120 G, sendo imediatamente congeladas para extração de RNA ou subcultivadas em RPMI 10% SFB.

- Análise de migração. Para a análise de migração, o sistema Matrigel/Transwell foi lavado com PBS, sendo posteriormente fixado em metanol gelado (-20°C) por 10 minutos. Logo após a fixação, o sistema foi lavado em PBS e corado com hematoxilina por um minuto. Após ser lavado em PBS novamente, o Transwell foi cortado com lâmina de bisturi nº11. O colado em lâmina de vidro com lamínula de 13 mm de diâmetro. Células presentes no Transwell foram contadas, sendo o número expresso o número total por Transwell ou por campo em magnificação de 400 X (microscópio E200, Nikon, Japão).

Todos os grupos experimentais foram realizadas em triplicata.

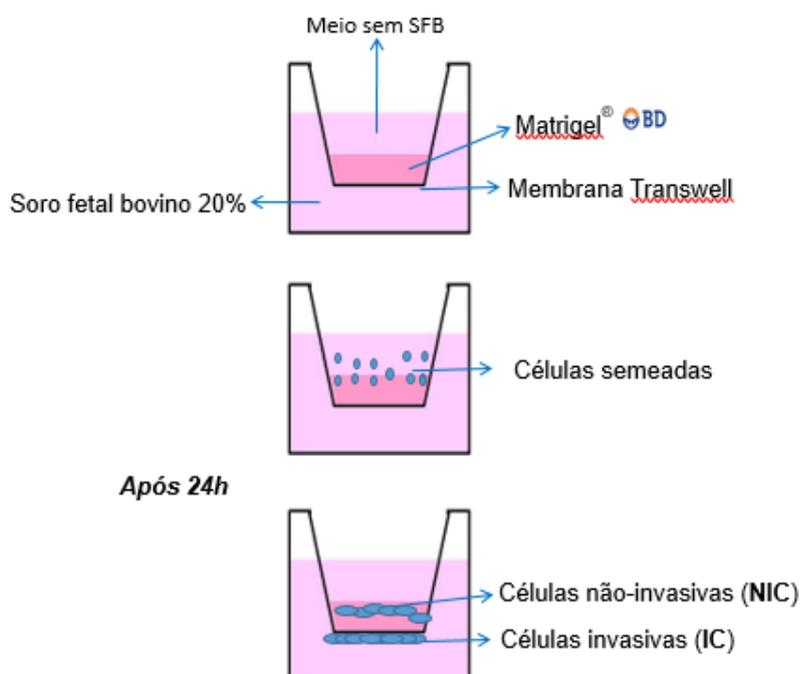


Figura 6. Esquema do método Matrigel/Transwell para separação de células NIC e IC. As células foram semeadas no sistema Matrigel/Transwell e após 24h as IC foram coletadas por tripsinização, enquanto as NIC foram obtidas diretamente da superfície do Matrigel.

3.3 Tratamento com interferon-gama (INF-gama) e RNA de interferência para IDO

Para avaliar a influência da indução da IDO1 sobre a invasão, as células T24 foram estimuladas com INF-gama, um potente indutor de sua expressão. Já para avaliar a inibição da IDO, utilizamos um RNA de interferência (silenciador) específico para IDO (siIDO).

O INF-gama humano foi adquirido comercialmente (SRP3058, Sigma-Aldrich, EUA) e sua concentração final de uso foi 50 ng/mL(ou 1.000 U/mL) em meio RPMI. As incubações ocorrem por um período de 24h.

O siIDO utilizado foi adquirido comercialmente (Silencer® Select IDO, cod4392420, Thermo Fisher, EUA) e o protocolo foi estabelecido de acordo com orientações do fabricante. Assim, células T24 foram cultivadas em placas de 6 wells até atingirem confluência de 80%. Após serem lavadas com PBS, as células receberam 2mL de meio RPMI sem SFB. Para a transfecção, 125µL de RPMI sem SFB foram acrescidos de 75 pmol de siIDO a partir de uma solução 5 pmol/µL em água. Paralelamente, 125µL de RPMI sem SFB foram acrescidos de 7,5µL de Lipofectamine 3000 (Invitrogen, EUA). Os dois volumes de 125µL foram misturados

e incubados por 15 minutos em temperatura ambiente. O volume final de 250 μ L foi acrescentado aos 2mL presentes no poço da placa de 6 wells contendo as células. As células permaneceram incubadas por 24h. Como controle, o mesmo procedimento acima foi realizado, porém utilizando-se um siRNA controle, o qual também foi adquirido comercialmente (SilencerSelectNegContr_siRNA4390843, Thermo Fisher, EUA). A confirmação do silenciamento foi confirmada por PCR em tempo real. Todos os grupos experimentais foram realizados em triplicatas.

3.4 *Scratch-wound*: análise de capacidade de migração

Células T24 foram cultivadas sobre lamínulas de vidro de 13mm de diâmetro (código 100013, Knittel Glass, Bielefeld, Alemanha) em placa de 24 wells (Corning, Nova York, EUA), contendo meio RPMI 1640 10% SFB. Ao atingirem confluência de 90%, foram incubadas por 24 horas com 300 μ L/well de meio contendo INF-gama na concentração de 1.000U/ml. Após 24h de estímulo, um risco foi feito pela extensão do poço com uma ponteira de 10 μ L (T300L, Axygen, Califórnia, EUA), a fim de verificar a capacidade de migração através do espaço entre o risco e as células, conforme as imagens da figura 7. A migração foi determinada medindo-se a área do risco logo após ter sido feito, subtraindo-se a área após 24 horas. A mensuração da área foi realizada com o programa de imagem (Image-Pro Plus, MediaCybernetics, EUA).

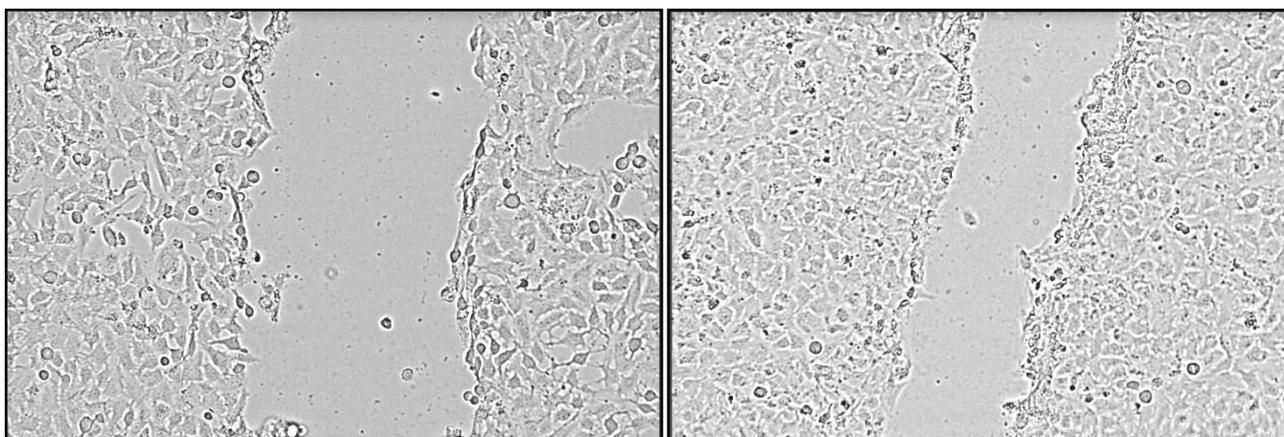


Figura 7. Imagens do experimento de *Scratch-wound*. Logo após o risco (esquerda) e após 24h do risco (direita) com células controle. Observa-se diminuição do espaço provocado pelo risco.

3.5 PCR em Tempo Real

3.5a Extração de RNA e transcrição reversa

RNA total foi extraído das células em cultura utilizando-se os kits PureLink® RNA mini kit (12183018A, Invitrogen, Califórnia, EUA) e PureLink® RNA micro kit (12183016, Invitrogen, Califórnia, EUA), seguindo-se o protocolo do fabricante. A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro (NanoDrop, ThermoScientific, EUA), medindo-se a densidade óptica nos comprimentos de onda 260 e 280nm. Foi feito o cálculo da concentração de RNA, expresso em µg/mL.

A partir da absorbância à 260nm. A leitura de 1 OD corresponde a uma solução pura de RNA em fita-simples na concentração de 40µg/mL. A leitura a 280nm foi utilizada para determinar a contaminação das amostras com proteínas. A análise foi feita baseando-se na razão entre as absorbâncias a 260 e 280nm e o valor aceitável foi de 1,7 a 2,0.

Para a transcrição reversa, foi utilizado o kit SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR (Invitrogen, Califórnia, EUA). Cinco microlitros de RNA total (80ng/µL) são acrescidos de 7,5µL de PCR Buffer 2X, 0,36µL de MgCl₂, 0,6µL de primer forward, 0,6µL de primer reverse, 0,79µL de água Milli-Q, 0,15µL de Rox e 0,3µL de SuperScript III. A mistura foi aquecida a 50°C por 30 minutos e depois a 95°C por 5 minutos.

3.5b PCR em tempo real

Para a PCR em tempo real foi usado o kit SYBR Green (Invitrogen, Califórnia, EUA). Quarenta ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, além de curva de melting, foram realizados no equipamento 7500™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Califórnia EUA).

Os primers usados neste estudo estão apresentados na Tabela 1. Como *housekeeping* humano, utilizamos o TBP (*TATA box binding protein*), e como *housekeeping* murino, usamos o gene da beta-actina.

Tabela 1- Primers utilizados para RT-PCR em tempo real

Gene alvo	Primer forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
TBP	TTCGGAGAGTTCTGGGATTGTA	TGGACTGTTCTTCACTCTTGGC
IDO	CCTGGGGTACATCACCATGGCG	TTGCGGGGCAGCACCTTTCG
CHOP	TTCACCACTCTTGACCCTGCTTC	TTCCTGGTTCTCCCTTGGTCTTC
CYP1A1	CTATCTGGGCTGTGGGCAA	CTGGCTCAAGCACAACCTGG

3.6 Animais

No presente estudo, são apresentados resultados de dois modelos realizados com animais, sendo um modelo ortotópico e um modelo ectópico de CB. Os dados são de animais utilizados em outros dois estudos prévios, os quais tiveram suas metodologias aprovadas pelo Comitê de Ética com Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA-UNINOVE, protocolos NA 0025-2015 e AN0015-2017).

Seis camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 (*mus musculus*, Rodentia, Mammalia), selecionados entre seis a oito semanas de vida, foram considerados no estudo. Estes animais foram criados no biotério central da Universidade Nove de Julho, sendo acondicionados sob condições normais, alocados em mini-isoladores com água e alimentação *ad libitum*.

3.7 Inoculação transuretral de células MB49

Células MB49 de câncer de bexiga murino foram cultivadas RPMI 10% SFB e após atingirem cerca de 80% de confluência, foram tripsinizadas e inoculadas nos camundongos C57BL/6.

Para o procedimento, os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/Kg, Cristália, São Paulo, Brasil) e xilasina (10 mg/Kg, Cristália, São Paulo, Brasil). Para o procedimento de cateterização transuretral, primeiramente verificamos a responsividade do animal, para então darmos início a este passo. Foi utilizado um cateter estéril de polietileno 24 G sem agulha, que após ser lubrificado com gel hidrossolúvel, foi delicadamente introduzido pela via transureteral. Inicialmente em um ângulo de 45° da calda em direção à cabeça, onde após ultrapassar a porção pélvica, foi alinhado em menor ângulo no sentido longitudinal do corpo do animal. Com auxílio de uma pipeta de 200µl, retiramos por sucção a urina que efluiu naturalmente, neste passo a ação caracterizará o posicionamento correto do cateter na bexiga urinária, garantindo assim o espaço volumétrico necessário para os próximos passos.

Para o procedimento de lesão urotelial, utilizamos 10µl de nitrato de prata (AgNO₃) 0,3 M, que primeiramente foi inserido no cateter, a qual foi instilado com auxílio de uma seringa de 1mL. Comprimindo o êmbolo a partir da marca de 100µL, este foi infundido pela pressão exercida através do ar comprimido, permanecendo no

lúmen intravesical por 10 segundos, garantindo assim uma lesão controlada, assim como um sítio de implantação apropriado as células MB49.

Após o tempo proposto, o conteúdo foi lavado por pelo menos 3 vezes com PBS, a fim de remover qualquer resíduo que pudesse interferir na integridade celular a ser implantada. Após este processo, efetuamos a instilação da alíquota de 100 μ L com 10x10⁴ células no cateter e as infundimos.

O animal permaneceu anestesiado, com a alíquota celular mantida no lúmen intravesical por 60 minutos, bastando deixar o êmbolo da seringa pressionado a partir da marca de 100 μ L. Terminado o tempo proposto, o animal permaneceu em pós-operatório com temperatura controlada e hidratação. O mesmo ficou em observação por um período entre 30 a 60 minutos.

Os animais foram eutanasiados após 2 semanas. A fim de determinar a expressão de IDO1, foi realizada imunohistoquímica.

3.8 Inoculação subcutânea de células MB49

O modelo ectópico usado foi o de inoculação de células MB49 no espaço subcutâneo da coxa direita. Para tanto as células MB49 foram cultivadas conforme descrito no item anterior, e os animais anestesiados com cetamina (100mg/Kg, Cristália, São Paulo, Brasil) e xilasina (10mg/Kg, Cristália, São Paulo, Brasil). Com uma seringa de 1mL, 100 μ L de PBS contendo 5X10⁵ células MB49 foram injetados no espaço subcutâneo da coxa direita.

Os animais foram eutanasiados após 2 semanas. A fim de determinar a expressão de IDO1, foi realizada imunohistoquímica.

3.9 Análise Imunohistoquímica

As secções de tecidos advindos de tumor de bexiga foram parafinizadas, cortadas com uma espessura de 4 μ m e fixadas a lâminas de vidro para histologia. As lâminas foram mantidas por 30 minutos, dentro de estufa à temperatura de 60°C e submetidas ao processo de desparafinização e reidratação.

Para a remoção da parafina e reidratação do tecido, as lâminas passaram por baterias constituídas por banhos em 3 fases de xilol, por 9 minutos cada, seguidas de 2 banhos em álcool absoluto, e 2 banhos em álcool 96% por 5 e 3 minutos, respectivamente.

Após a remoção do álcool, através de um banho em água destilada por 5 minutos, os tecidos foram submetidos à irradiação, com micro-ondas, por 15 minutos, em tampão de citrato, para aumentar a recuperação antigênica e mantidos em temperatura ambiente por 20 minutos para esfriarem.

A seguir, os cortes foram mergulhados em uma solução de bloqueio, de peroxidase endógena, composto por metanol e Peróxido de hidrogênio (concentração final de 3%) protegidos da luz, por 30 minutos, e após, a lavagem em PBS, tiveram os cortes isolados com o uso de PAP Pen, e submetidas à bloqueios endógenos de avidina e biotina, por 15 minutos cada, com lavagens em PBS entre as etapas.

Para aumentar o bloqueio de ligações inespecíficas, as amostras foram submetidas a um último bloqueio composto por 6% de leite em pó (Nestlé Brasil LTDA, São Paulo, Brasil). Em seguida, as lâminas foram incubadas com anti-IDO (Abcam, Cambridge, Reino Unido), na diluição 1:10 em PBS com leite a 6%. Para completar o sanduíche, as secções foram incubadas com reagentes LSAB + System-HRP (K0690; Dako Co, Dinamarca). Finalmente, o substrato-cromógeno DAB foi usado para completar a reação (K346811; Dako Co, Dinamarca).

3.10 Análise estatística

Para a comparação entre os diferentes grupos, foi utilizado o teste t-Student não pareado. A significância estatística será considerada a partir do $p < 0,05$. Todos os resultados estão representados pela média \pm erro padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Expressão de IDO em linhagens de CB

Todas as três linhagens celulares de CB analisadas no estudo, uma murina (MB49) e duas humanas (RT4 e T24), apresentaram expressão constitutiva de IDO. Como o gene *housekeeping* para as MB49 foi diferente do gene *housekeeping* usado para as células RT4 e T24, não comparamos as células murinas com as células humanas, contudo, uma comparação foi feita entre as células humanas. Como demonstrado na Figura 8, células T24 apresentam uma expressão de IDO significativamente maior do que células RT4 (Expressão relativa de $1,0 \pm 0,2$ em RT4 e 499 ± 96 em T24; $p < 0,05$).

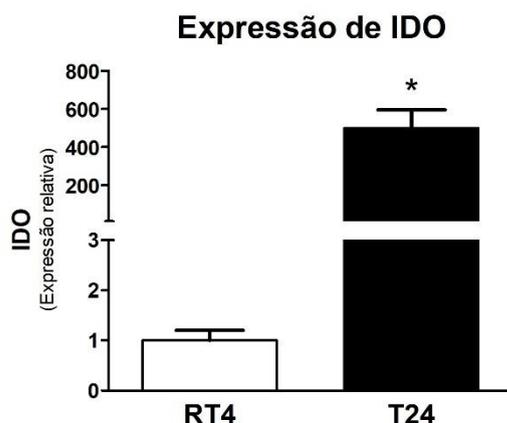


Figura 8. Comparação entre as linhagens celulares de carcinoma da bexiga RT4 e T24 para expressão de IDO1. As células RT4 e T24 expressam IDO1 constitutivamente, mas a expressão é significativamente maior nas células T24. * $p < 0,05$.

4.2 Expressão de IDO e marcadores das vias GCN2 e AHR em modelo in vitro de invasão

A expressão de IDO1 é constitutiva em células T24. A PCR em tempo real demonstrou que há uma diminuição significativa da expressão de IDO1 em células no processo de invasão, ou seja, imediatamente ao alcançarem o transwell no sistema Matrigel/Transwell (Expressão relativa de $1,0 \pm 0,2$ em NIC e $0,2 \pm 0,0$ em IC; $p < 0,05$) (Figura 9). Porém, não conseguimos detectar alteração significativa após duas semanas da invasão (Expressão relativa de $1,0 \pm 0,2$ em NIC e $2,3 \pm 1,3$ em IC) (Figura 9).

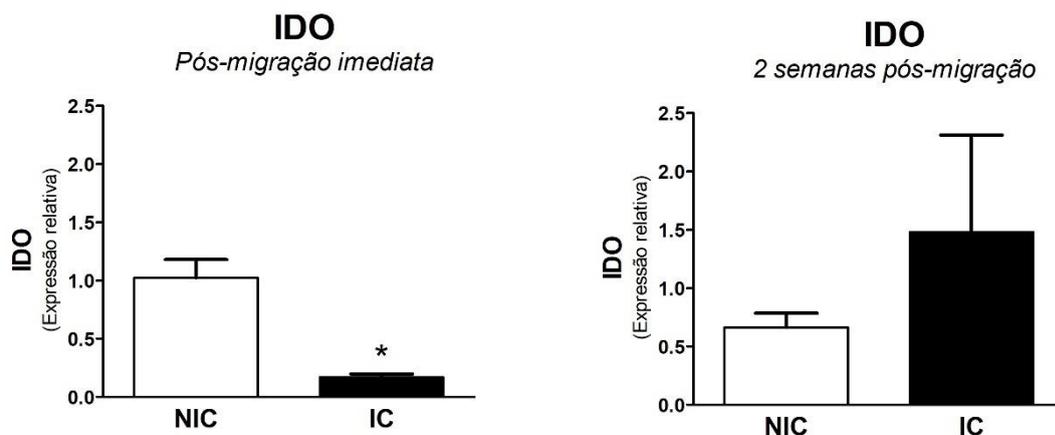


Figura 9. Análise de expressão para IDO1 em células T24 não invasivas (NIC) e invasivas (IC). As células foram semeadas no sistema Matrigel/Transwell e após 24h as IC foram coletadas por tripsinização, enquanto as NIC foram obtidas diretamente da superfície do Matrigel para extração de RNA. As IC expressaram significativamente menos IDO1 em comparação com as NIC. Quando as células separadas foram cultivadas por duas semanas em condições normais, não foi possível detectar alteração significativa (à direita), mostrando que a expressão de IDO1 é transitória durante o processo de invasão celular. * $p < 0,05$ vs. NIC * $p < 0,05$ vs. NIC.

Com relação às vias de ativação da IDO1, a via GCN2 é representada pela expressão do gene CHOP. Como demonstrado na Figura 10, expressão de CHOP também diminuiu nas células invasivas imediatamente à invasão (Expressão relativa de $1,1 \pm 0,2$ em NIC e $0,4 \pm 0,1$ em IC; $p < 0,05$). Contudo, após 2 semanas de subcultivo essa diferença não foi mais observada (Expressão relativa de $1,0 \pm 0,1$ em NIC e $1,2 \pm 0,2$ em IC).

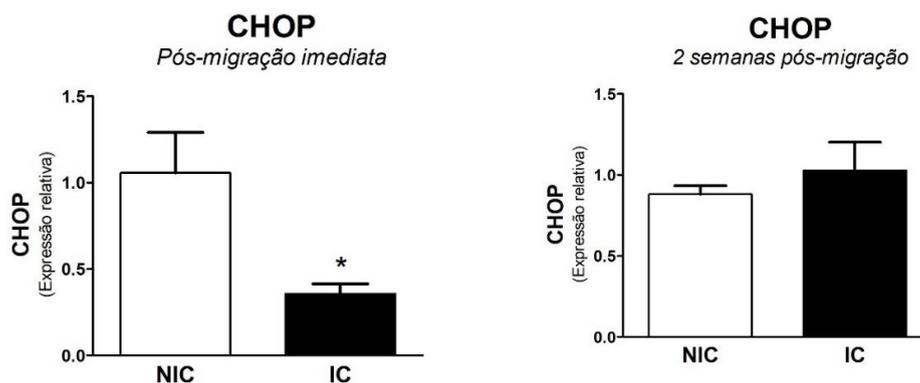


Figura 10. Análise de expressão para CHOP em células T24 não invasivas (NIC) e invasivas (IC). As células foram semeadas no sistema Matrigel/Transwell e após 24h as IC foram coletadas por tripsinização, enquanto as NIC foram obtidas diretamente da superfície do Matrigel para extração de RNA. As IC expressaram significativamente menos CHOP em comparação com as NIC. Quando as células separadas foram cultivadas por duas semanas em condições normais, essa diferença foi perdida (à direita), mostrando que a expressão do gene CHOP é transitório durante o processo de invasão celular. * $p < 0,05$ vs. NIC.

A ativação do AHR é representada pela expressão do gene CYP1A1. A expressão de CYP1A1 apresentou-se diminuída em células T24 imediatamente à invasão (Expressão relativa de $1,0 \pm 0,2$ em NIC e $0,3 \pm 0,0$ em IC; $p < 0,05$) e essa diferença foi perdida, após, as células serem subcultivadas, durante 2 semanas (Expressão relativa de $1,1 \pm 0,2$ em NIC e $0,8 \pm 0,3$ em IC) (Figura 11).

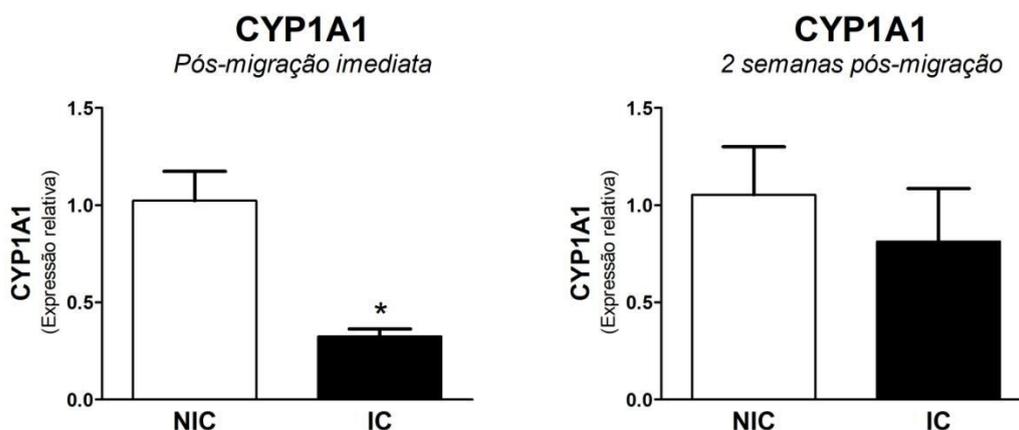


Figura 11. Análise de expressão para CYP1A1 em células T24 não invasivas (NIC) e invasivas (IC). As células foram semeadas no sistema Matrigel/Transwell e após 24h as IC foram coletadas por tripsinização, enquanto as NIC foram obtidas diretamente da superfície do Matrigel para extração de RNA. As IC expressaram significativamente menos CYP1A1 em comparação com as NIC. Quando as células separadas foram cultivadas por duas semanas em condições normais, essa diferença foi perdida (à direita), mostrando que a expressão do gene CYP1A1 é transitório durante o processo de invasão celular. * $p < 0,05$ vs. NIC.

4.3 Indução da expressão de IDO na invasão tumoral

O INF- γ foi usado como molécula indutora de IDO. A incubação de células T24 com INF- γ promoveu um aumento marcante da expressão de IDO1 (Expressão relativa de $1,3 \pm 0,5$ em T24 e $656 \pm 15,0$ em T24+INF- γ ; $p < 0,05$). Conforme demonstrado na Figura 12, a incubação com INF-gama diminuiu significativamente a invasão das células na análise de Transwell/Matrigel e a migração pela análise *scratch-wound*.

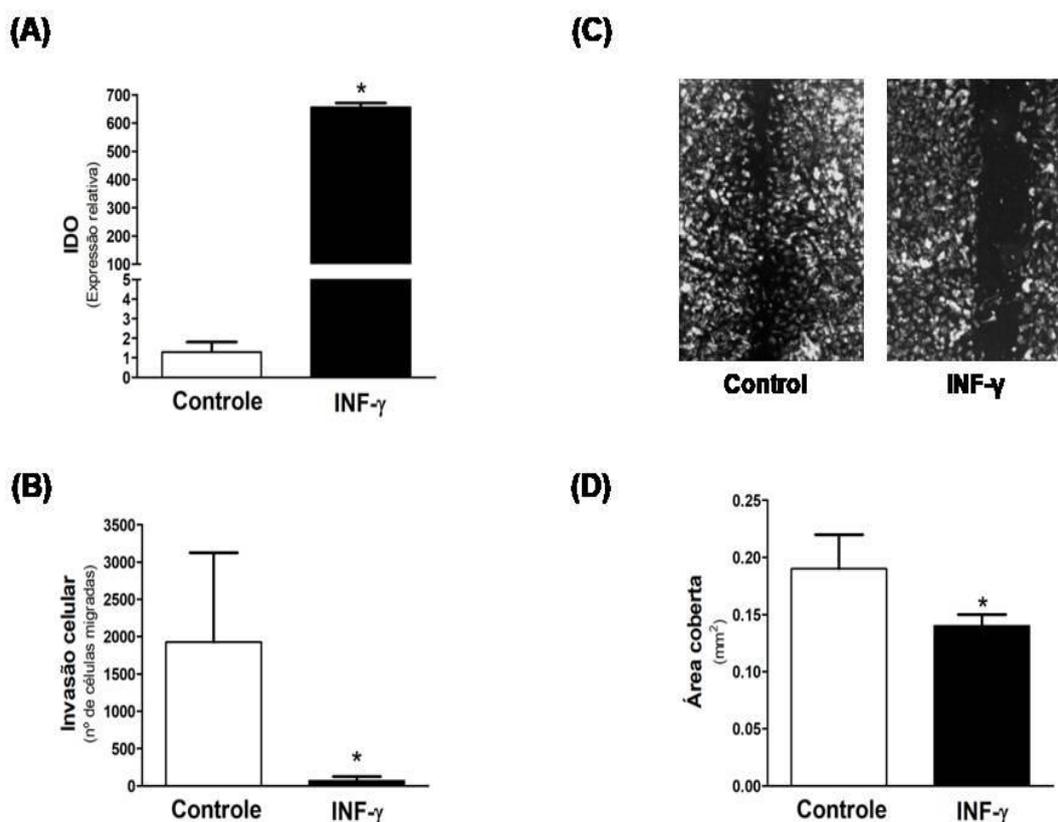


Figura 12. (A) Expressão de IDO1 em células T24 estimuladas com INF- γ . (B) Análise da invasão celular através de sistema Matrigel/Transwell após incubação de 24h com INF- γ . (C) Imagem do método *scratch-wound* após 24 h de migração e (D) análise da área preenchida.

4.4 Inibição da expressão de IDO na invasão tumoral

Para avaliar o efeito da inibição da expressão da IDO sobre a invasão celular, foi usado um RNA de interferência (siIDO). Conforme demonstrado na Figura 13, a inibição traducionalda IDO inibiu significativamente a invasão celular no sistema Matrigel/Transwell.

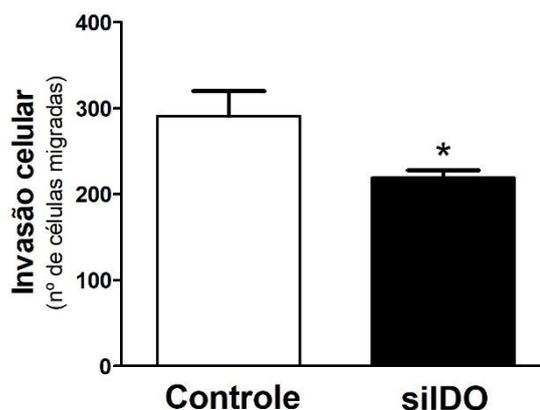


Figura 13. Efeito da inibição da IDO1 pelo siRNA na invasão celular. A inibição da IDO1 diminuiu a invasão celular no sistema Matrigel / Transwell. * $p < 0,05$ vs. Controle.

4.5 Inibição da atividade da IDO na invasão tumoral

O sistema Matrigel/Transwell também foi usado para avaliar o efeito da inibição química da IDO1 sobre a invasão celular. Conforme demonstrado na Figura 14, não houve diferença significativa.

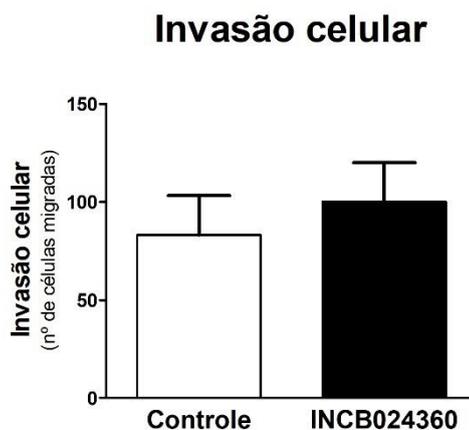


Figura 14. Efeito da inibição da IDO1 pelo inibidor químico INCB024360 na invasão celular. Não houve diferença significativa na invasão celular no sistema Matrigel/Transwell após o uso do INCB024360.

4.6 Expressão de IDO1 em modelo in vivo de invasão

A análise histológica e de imunohistoquímica permitiu avaliar qualitativamente a expressão de IDO1. Avaliamos a área de invasão da musculatura lisa (no caso do modelo ortotópico) e da musculatura esquelética (no caso do modelo ectópico). Conforme demonstrado na Figura 15, a expressão de IDO1 foi predominantemente baixa em células tumorais em áreas de invasão da musculatura, sendo que as células mais afastadas do fronte (periferia) expressavam mais IDO1.

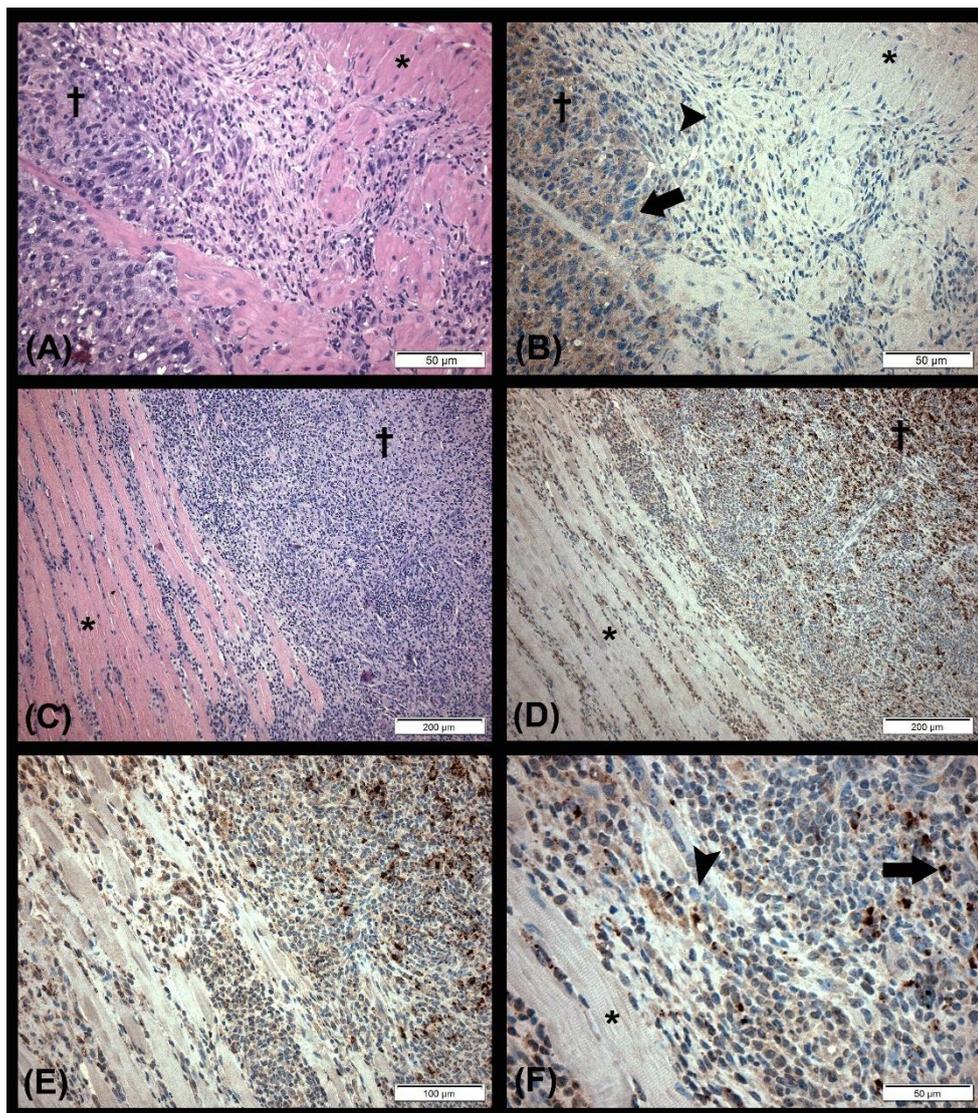


Figura 15. Modelos ortotópicos e ectópicos de CB foram realizados para avaliar a imunocoloração de IDO1. Camundongos C57Bl6 receberam células MB49 ortotopicamente, sendo sacrificados após duas semanas (A e B). (A) O MB49 formou um tumor intravesical (cruzado) e infiltrou-se acentuadamente no músculo detrusor (asterisco). (B) A imunocoloração para IDO1 era forte no centro do tumor (seta), enquanto a frente do tumor apresentava fraca expressão de IDO1 (ponta de seta). No modelo ectópico, o C57Bl6 recebeu células MB49 por via subcutânea e foi seguido por duas semanas. (C) Um tumor sólido foi formado na região de inoculação (cruz), enquanto muitas células MB49 se infiltraram no músculo esquelético da coxa (asterisco). A imunocoloração de IDO1 foi forte na região central do tumor (seta), enquanto a imunocoloração fraca foi observada nas células infiltrantes (ponta de seta).

5 DISCUSSÃO

Como já mencionado, o CB é uma neoplasia maligna com um tratamento considerado de alto custo, devido, principalmente, às altas taxas de recorrência, que exigem acompanhamento ao longo da vida, com vários procedimentos cirúrgicos (4). Escape imunológico, ou seja, a capacidade que o tumor tem de escapar do sistema imunológico e metástase são características de diversos tipos de câncer, incluindo também o câncer de bexiga (36).

Embora a IDO1 seja reconhecida como uma molécula imunomoduladora, ela apresenta efeitos não imunológicos em alguns tumores. Em Hudolin e colaboradores (2017) o mesmo concluiu que há uma diferença na expressão da IDO1 quando se compara células normais de bexiga urinária humana com as células caracterizadas como não-invasivas.

No presente estudo, investigamos o papel da IDO1 na invasão de células de CB. Como modelo celular foram usadas as células T24 de câncer de bexiga, uma linhagem que representa grau 3 e músculo invasiva, além de expressarem IDO constitutivamente. Pela primeira vez, comparamos a expressão de IDO entre células T24 e RT4, esta última representativa de CB grau 1 e não-músculo invasiva. Pudemos observar que a expressão de IDO é significativamente maior em T24 do que em células RT4. Esse achado reforça que o aumento da expressão de IDO correlaciona-se com a progressão tumoral e conseqüentemente com pior prognóstico, achados demonstrados em estudos clínicos com avaliação de espécimes de CB (32-34). Embora o grande indutor biológico da expressão de IDO seja o INF-gama, sua expressão pode ser influenciada por outros fatores (37). É provável que com a instabilidade genômica da célula neoplásica, o gene da IDO pode ser super expresso ou receber influência de outros produtos gênicos anormalmente expressos. Porém isso é uma hipótese, apontando-se a necessidade de novos estudos.

Quando as células T24 foram submetidos ao sistema Matrigel/Transwell, a invasão celular no período de 24h ocorreu, porém, a quantidade de células que invadiram o Transwell foi menor do que a quantidade que ficou acima do transwell. Esse fenômeno é interessante pois reforça a heterogeneidade das linhagens de células tumorais, onde pudemos constatar que há subpopulações que diferenciam-se por suas habilidades. Em estudo realizado por nosso grupo, inoculamos células

T24 no espaço subcapsular renal de animais atômicos e constatamos comportamentos diferentes, onde subpopulações (ou subclones) invadiram o parênquima renal, enquanto outras permaneceram imóveis ou formaram uma pseudovesícula na região subcapsular (38). Com relação à expressão de IDO, permanecia o questionamento de que talvez sua expressão fosse específica de subpopulações, as quais teriam o gene da IDO ativado de forma constitutiva. Por essa razão, partimos para a análise da IDO entre subpopulações NIC e IC, desenvolvendo o método pelo sistema Matrigel/Transwell. Os resultados demonstram que a expressão de IDO foi significativamente menor nas células que invadiram (IC) em comparação com as NIC logo após a incubação de 24h, e essa expressão diminuída foi acompanhada pela redução da expressão de CHOP e CYP1A1, genes ativados pelas vias GCN2 e AHR sob a sinalização da IDO. No entanto, quando separadas e subcultivadas por mais de duas semanas, a diferença na expressão de IDO, CHOP e CYP1A1 desaparece entre as células NIC e IC, demonstrando que a expressão oscila durante o processo de invasão. Para avaliar essa oscilação em tempo real, estamos construindo um vetor com um gene repórter (luciferase) sob o comando do promotor da IDO, a fim de avaliar a fluorescência emitida pela célula toda vez que a expressão de IDO for induzida ou suprimida. Infelizmente, ainda não temos resultados para apresentar na presente dissertação, mas esperamos que essa ferramenta reforce que a expressão de IDO é transitória.

Frente à mudança da expressão da IDO no processo de invasão, procuramos induzir a expressão de IDO, bem como inibi-la, a fim de verificar se a modulação da IDO surtiria efeito sobre a invasão.

Para a indução, usamos o INF-gama, pois é a principal citocina indutora de IDO. Conforme esperado, o INF-gama induziu significativamente a expressão de IDO em cultura de células T24. Na análise de invasão (Matrigel/Transwell) e de migração (*scratch-wound*), a incubação com INF-gama inibiu significativamente estes eventos celulares. Esse resultado sugere que um aumento exacerbado da expressão de IDO interfere na invasão destas células. Contudo, um importante viés desse experimento é o fato do INF-gama promover efeito anti-tumoral por diferentes mecanismos que independem da IDO, os quais influenciariam inevitavelmente a taxa de invasão celular. O IFN- γ desempenha um papel importante na proteção contra o desenvolvimento do tumor. A sinalização do IFN- γ quando interrompida em células cancerígenas que antes respondiam ao mesmo, exibem aumento da

tumorigenicidade e crescimento mais agressivo do tumor (39). É provável que a melhor forma seria induzir a expressão de IDO por meio de vetores de expressão, pois teríamos de forma mais isolada seu efeito sobre o comportamento celular. Infelizmente não dispomos dessa ferramenta molecular.

Para a inibição da IDO, optamos por usar um RNA de interferência para a IDO (siIDO) e também seu inibidor químico INCB024360. A incubação prévia com siIDO inibiu a invasão celular, sugerindo que a expressão de IDO tem influência sobre a invasão de célula T24. No entanto, não detectamos efeito com o inibidor INCB024360. Uma possível hipótese para esse resultado do inibidor seria a concentração usada no meio de cultura. Nos baseamos no estudo de Liu e colaboradores que usaram a mesma concentração para inibir a IDO em células HeLa (40). Ademais, estudo prévio realizado pelo nosso grupo demonstrou que a concentração usada foi eficaz para reduzir significativamente a produção de quinurenina em cultura de células T24 (dados ainda em processamento). Um ponto importante a ser levantado é o porquê do siIDO inibir a invasão e o inibidor químico não exercer tal efeito. A IDO foi sempre considerada por conta de sua atividade enzimática, porém, em 2011, Palotta e colaboradores demonstraram que a IDO funciona como molécula sinalizadora em células dendríticas sob ação do TGF-beta, independente de sua ação como enzima (41). Desta maneira, é provável que a participação da IDO na invasão de células T24 esteja relacionada a esse mecanismo proposto por Pallotta e colaboradores, o que explicaria a ausência de efeito quando usado um inibidor químico de sua ação enzimática.

Na fase com modelo animal, células MB49 de CB murino foram inoculadas pela via transuretral (ortotópico) e pela via subcutânea (ectópico) em camundongos C57Bl6. São modelos que permitem a avaliação da invasão tumoral *in vivo*, onde as células MB49 invadem a musculatura lisa da bexiga (ortotópico) ou a musculatura esquelética da coxa (ectópico). A análise imunohistoquímica reforçou o achado *in vitro*, ou seja, a expressão de IDO não foi encontrada em todas as células tumorais após duas semanas da inoculação e as células mais próximas da musculatura (lisa ou esquelética) expressavam menos IDO do que as células mais afastadas (centrais).

Resumidamente, os resultados do estudo demonstram que a expressão de IDO oscila durante a invasão de células de CB, provavelmente porque exerce efeito sobre tal fenômeno, uma vez que sua inibição traducional levou ao retardo do

processo. Frente a esses achados, levantamos duas hipóteses, as quais deverão ser investigadas nos próximos estudos. Seriam elas: (i) a expressão de IDO diminui durante a invasão celular. Ela pode influenciar positivamente a invasão, porém sua expressão cai durante o processo como um feedback negativo, a fim de evitar exacerbação do processo. Em estudo prévio de nosso grupo, demonstramos que a incubação de células T24 com TGF-beta, um potente indutor de invasão via transição epitélio-mesenquimal, diminui a expressão de IDO (36); (ii) a expressão de IDO aumenta nas células destinadas à invasão e permanece alta durante a migração, porém diminui quando as células alcançam o microambiente “favorável”. Seria o efeito do soro fetal bovino no sistema Matrigel/Transwell e o microambiente que impulsiona as células a migrarem para a região muscular nos modelos *in vivo*. Vale ressaltar que são apenas hipóteses e que estudos futuros são necessários para entendermos melhor o mecanismo pelo qual a IDO influencia tal comportamento celular.

Por fim, buscando respostas mais uma vez no aparelho reprodutor feminino, a IDO foi descrita em células trofoblásticas, células que trabalham ativamente com transição epitélio-mesenquimal e que assumem fenótipo invasivo para garantir a implantação do blastocisto no endométrio materno. Da mesma forma que mais tardiamente a IDO placentária protegerá o embrião contra o sistema imune materno, a IDO trofoblástica garantirá a proteção blastocística nessa fase mais inicial da embriogênese. O fato é que, embora ainda controverso, estudos demonstram que a expressão de IDO oscila à medida que os trofoblastos vão se diferenciando em sincitiotrofoblastos e em citotrofoblastos invasores (42,43), permitindo que façamos uma analogia entre o processo de implantação e decidualização com o que encontramos na invasão do CB. Ademais, estudos demonstram que a baixa expressão de IDO correlaciona-se com pouca invasão de camada média de artérias espiraladas durante a placentação, o que gera má formação placentária com consequente quadro de pré-eclâmpsia com o avanço da gravidez (44,45).

6 CONCLUSÃO

- Células de CB expressam constitutivamente IDO, porém sua expressão oscila durante o processo de invasão, bem como dos genes relacionados às vias induzidas por ela;
- A expressão de IDO influencia a invasão tumoral, uma vez que sua inibição com RNA de interferência diminui a invasão;
- Como o inibidor químico da IDO não influenciou a invasão tumoral é provável que seu efeito seja independente de sua ação enzimática.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: incidencia de cancer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2017.
2. Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018 Jan;68(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21442.
3. National Cancer Institute. Statistics at a Glance. [online]. 2018. Disponível em : <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/common.html>.
4. Babjuk M, et al. EAU Guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2016. *Eur Urol.* 2017;71(3):447–461.
5. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, Kassouf W, Kiemeny LA, La Vecchia C, Shariat S, Lotan Y. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol.* 2013; 63(2):234-41.
6. OnerSanli, Jakub Dobruch, Margaret A. Knowles, Maximilian Burger, Mehrdad Alemozaffar, Matthew E. Nielsen, Yair Lotan. Bladder Cancer. *Nature Reviews Disease Primers.* 2017;3(17022).
7. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science.* 1998;281(5380):1191-3.
8. Yamamoto S, Hayaishi O. Tryptophan pyrrolase of rabbit intestine. D- and L-tryptophan-cleaving enzyme or enzymes. *J Biol Chem.* 1967;242(22):5260-6.
9. MacKenzie CR, Heseler K, Müller A, Däubener W. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines. *Curr Drug Metab.* 2007;8(3):237-44.
10. Terness P, Bauer TM, Röse L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med.* 2002 Aug 19;196(4):447-57.
11. Dowling RJ, Topisirovic I, Fonseca BD, Sonenberg N. Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. *BiochimBiophysActa.* 2010;1804(3):433-9.
12. Harding HP, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell.* 2003;11(3):619-33.
13. Crosby JS, Chefalo PJ, Yeh I, Ying S, London IM, Leboulch P, Chen JJ. Regulation of hemoglobin synthesis and proliferation of differentiating erythroid cells by heme-regulated eIF-2alpha kinase. *Blood.* 2000;96(9):3241-8.
14. Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ.* 2004;11(4):372-80.

15. Litzemberger UM, et al. Constitutive IDO1 expression in human cancer is sustained by an autocrine signaling loop involving IL-6, STAT3 and the AHR. *Oncotarget*. 2014;5(4):1038-51.
16. Gramatzki D, et al. Aryl hydrocarbon receptor inhibition downregulates the TGF-beta/Smad pathway in human glioblastoma cells. *Oncogene*. 2009;28(28):2593-605.
17. Tsai CH, et al. The inhibition of lung cancer cell migration by AhR-regulated autophagy. *Sci Rep*. 2017;7:41927.
18. Ishida M, et al. Activation of aryl hydrocarbon receptor promotes invasion of clear cell renal cell carcinoma and is associated with poor prognosis and cigarette smoke. *Int J Cancer*. 2015;137(2):299-310.
19. Andersson P, et al. A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(15):9990-5.
20. Platten M, Wick W, Van Den Eynde BJ. Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO1 and tryptophan depletion. *Platten Cancer Res*. 2012;72(21):5435-40.
21. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*. 2003;9(10): 1269–74.
22. Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, Sutanto-Ward E, Prendergast GC. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nature Med*. 2005;11: 312–319.
23. Ino K, Yoshida N, Kajiyama H, Shibata K, Yamamoto E, Kidokoro K, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer. *Br J Cancer*. 2006;95: 1555–61.
24. Takao M, et al. Increased synthesis of indoleamine-2,3-dioxygenase protein is positively associated with impaired survival in patients with serous-type, but not with other types of, ovarian cancer. *Oncol Rep*. 2007; 17:1333–1339.
25. Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, Schneeberger S, Obrist P, Winkler C, et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Res*. 2006;15;12(4): 1144–51.
26. Pan K, et al. Expression and prognosis role of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008;134:1247–1253.
27. Ishio T, Goto S, Tahara K, Tone S, Kawano K, Kitano S. Immunoinhibitory role of indoleamine 2,3-dioxygenase in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004;19: 319–26.

28. Riesenberg R, Weiler C, Spring O, Eder M, Buchner A, Popp T, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor endothelial cells correlates with long-term survival of patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007;13: 6993–7002.
29. Feder-Mengus C, et al. High expression of indoleamine 2,3-dioxygenase gene in prostate cancer. *Eur J Cancer*. 2008;44(15):2266-75.
30. Lemos H, Huang L, Prendergast GC, Mellor AL. Immune control by amino acid catabolism during tumorigenesis and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(3):162-175.
31. Werner ER, Werner-Felmayer G, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Wachter H. Influence of interferon-gamma and extracellular tryptophan on indoleamine 2,3-dioxygenase activity in T24 cells as determined by a non-radiometric assay. *Biochem J*. 1988;256(2):537-41.
32. Yang C, Zhou Y, Zhang L, Jin C, Li M, Ye L. Expression and function analysis of indoleamine 2 and 3-dioxygenase in bladder urothelial carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(2):1768-75.
33. Hudolin T, Mengus C, Coulot J, Kastelan Z, El-Saleh A, Spagnoli GC. Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Non-muscle-invasive Bladder Cancer. *Anticancer Research*. 2017;37: 1375-1380.
34. Yuh-Shyan Tsai, Yeong-Chin Jou, Hsin-Tzu Tsai, Tzong-Shin Tzai. MP57-13 Indoleamine-2,3-dioxygenase -1 expression upregulates zeb2 expression through microrna-200c signaling in human bladder cancer. *Journal of Urology*. 2019; 201(4): e817-e818.
35. Davies G, Jiang WG, Mason MD. Cell-cell adhesion molecules and their associated proteins in bladder cancer cells and their role in mitogen induced cell-cell dissociation and invasion. *Anticancer Res*. 1999;19(1A):547-52.
36. Brito RB, et al. 1-Methyl-D-tryptophan potentiates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in T24 human bladder cancer cells. *PLoS One*. 2015;10(8): e0134858.
37. King NJ, Thomas SR. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(12):2167-72. Epub 2007 Jan 20.
38. Souza DM, Matheus LH, Silva CS, Ferreira JM, Dellê H. Renal Subcapsular Space of Balb/c Nude Mice as a Route for Evaluating Subpopulations of Human Bladder Carcinoma Cells. *In Vivo*. 2016 Jul-Aug;30(4):383-6.
39. Brandacher G, Winkler C, Schroecksadel K, Margreiter R, Fuchs D. Antitumoral Activity of Interferon- γ Involved in Impaired Immune Function in Cancer Patient. 2006 Aug;7(6):599-612.

40. Liu X, Shin N, Koblisch HK, Yang G, Wang Q, Wang K, et al. Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity. *Blood*. 2010 Apr 29;115(17):3520-30.
41. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, Bianchi R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol*. 2011; 31;12(9): 870–8.
42. Ban Y, Chang Y, Dong B, Kong B, Qu X. Indoleamine 2,3-dioxygenase levels at the normal and recurrentspontaneous abortion fetal-maternal interface. *J Int Med Res*. 2013 Aug;41(4):1135-49.
43. Hönig A, Rieger L, Kapp M, Sütterlin M, Dietl J, Kämmerer U. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravilloustrophoblast supports role of the enzyme for materno-fetaltolerance. *J ReprodImmunol*. 2004 Apr;61(2):79-86.
44. Santoso DI, Rogers P, Wallace EM, Manuelpillai U, Walker D, Subakir SB. Localization of indoleamine 2,3-dioxygenase and 4-hydroxynonenal in normal and pre-eclampticplacentae. *Placenta*. 2002 May;23(5):373-9.
45. Keaton SA, Heilman P, Bryleva EY, Madaj Z, Krzyzanowski S, GritJ,et al. AlteredTryptophanCatabolism in Placentas FromWomenWith Pre-eclampsia. *Int J TryptophanRes*. 2019 Apr 8;12:1178646919840321.