

Luiz Henrique Gomes Matheus

Estudo da indoleamina 2,3-dioxigenase 1 no câncer de bexiga: correlação
com parâmetros clinicopatológicos, relação com BCG e sua inibição
química

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho
para obtenção do título de Doutor em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-graduação em
Medicina.

SÃO PAULO

2020

Luiz Henrique Gomes Matheus

Estudo da indoleamina 2,3-dioxigenase 1 no câncer de bexiga: correlação com parâmetros clinicopatológicos, relação com BCG e sua inibição química

Tese apresentada à Universidade
Nove de Julho para obtenção do título
de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-graduação em
Medicina.

Orientador:

Prof. Humberto Dellê.

SÃO PAULO

2020

Matheus, Luiz Henrique Gomes.

Estudo da indoleamina 2,3-dioxigenase 1 no câncer de bexiga: correlação com parâmetros clinicopatológicos, relação com BCG e sua inibição química. / Luiz Henrique Gomes Matheus. 2020.

98 f.

Tese(Doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2020.

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

Indoleamina 2,3-dioxigenase. 2. Câncer de bexiga. 3. 1-metil-D-triptofano. 4. IFN- γ . 5. BCG.

Dellê, Humberto.II. Título.

CDU 616



São Paulo 23 de março de 2020

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno: **LUIZ HENRIQUE GOMES MATHEUS**

Título da tese: **ESTUDO DA ENDOLEAMINA 2,3 – DIOXIGENASE NO CÂNCER DE BEXIGA: CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS CLINICOPATOLÓGICOS, RELAÇÃO COM BCG E SUA INIBIÇÃO QUÍMICA.**

Presidente: PROF. DR. HUMBERTO DELLÉ

Membro: PROFA. DRA. MARIA APARECIDA DALBONI

Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS

Membro: PROFA. DRA. MARIA CAROLINA RAMOS MORENO

Agradecimentos

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 desta nova etapa para a consolidação de minha vida acadêmica.

Ao meu orientador, professor Humberto Dellê, por sua dedicação e compromisso em ensinar e me instruir desde o período de iniciação científica, sendo meu primeiro contato e base em um caminho da pesquisa, bem como um exemplo forte de ética e transparência na pesquisa.

Agradeço à minha família, que me forneceu apoio e 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 e alimentando a curiosidade nata que me motiva desde a infância.

Agradeço grandemente aos companheiros e colaboradores do grupo de pesquisa, por seu apoio e grande auxílio técnico, intelectual e pessoal, e todos os demais que contribuíram para a execução deste trabalho, em especial ao professor José Pontes Júnior e Janaína Mendes Ferreira, com sua colaboração e auxílio na coleta, separação e triagem das biópsias utilizadas no estudo, além do grande empenho no acompanhamento e rastreamento dos dados dos pacientes. Agradeço ao auxílio da Dra. Kátia, por compartilhar sua experiência e auxiliar na classificação e seleção dos casos de interesse usados no estudo.

Agradeço aos alunos Ana Estela, Stephanie, Andressa, Lucas, Marciano, Bruno, Maiara e a todos os demais alunos de iniciação científica e mestrado que prestaram grande auxílio não só no desenvolvimento do trabalho, mas principalmente em meu crescimento intelectual, permitindo que atuasse como coorientador, mas estabelecendo também relações de amizade e apoio nas rotinas diárias do laboratório.

“Durante a nossa breve estada no planeta Terra, devemos nós mesmos e nossos descendentes ter a oportunidade de explorar, em parte porque é divertido fazer isso. Mas há uma razão muito mais nobre. Se o nosso conhecimento do cosmos deixar de se expandir, corremos o risco de regredir para o ponto de vista infantil em que o universo figurava e literalmente girava em torno de nós “.

- Neil de Grasse Tyson

Sumário

Resumo	12
Abstract	14
1 Introdução	15
1.1 Câncer no mundo	15
1.2 Câncer de Bexiga (CB)	15
1.3 Principais fatores de risco do CB.....	16
1.4 Abordagens terapêuticas convencionais	16
1.5BCG e CB.....	17
1.6A Indoleamina 2,3-dioxigenase 1	19
1.6.1 Principais vias acionadas pela IDO	22
1.6.1a Via GCN2.....	23
1.6.1b Via AHR.....	25
1.6.2IDO e câncer	27
1.7IDO e BCG	29
1.8Inibidores da IDO e câncer	30
1.8.11-Metil-D-Triptofano (MT)	31
1.8.2INCB 024360.....	32
2 Justificativa	35
3 Objetivos	36
4 Materiais e métodos	37
4.1 Fase 1: Avaliação da IDO em espécimes humanas de CB	37
4.1.1 Casuística.....	37
4.1.2 Elaboração e confecção do <i>Tissue Micro Array</i> (TMA).....	38
4.1.3 Imunohistoquímica para IDO em espécimes de CB humano.....	39
4.1.4Análise imunohistoquímica	40
4.2 Fase 2: Efeito do BCG sobre a expressão de IDO1 no CB.....	40
4.2.1 Análise <i>in vitro</i>	40
4.2.1a Expressão de IDO em células humanas de CB incubadas com BCG.....	41
4.2.1bExpressão de IDO em células humanas de CB incubadas com BCGe com células mononucleares.....	42
4.2.2 Análise <i>in vivo</i>	44
4.2.2a Modelo animal de CB	44
4.2.2b Grupos experimentais, acompanhamento e eutanásia	45

4.2.2c Análise imunohistoquímica em CB	49
4.3 Fase 3: Efeito dos inibidores da IDO sobre o CB	50
4.3.1 Análise <i>in vitro</i>	50
4.3.2 Análise <i>in vivo</i>	51
4.3.3 Análise da atividade da IDO	52
4.4 Biologia molecular	52
4.4.1 Extração de RNA e síntese de cDNA	52
4.4.2 PCR em tempo real	53
4.5 Análise estatística	54
5 Resultados	55
5.1 Fase 1: Correlação entre IDO e parâmetros clinicopatológicos	55
5.1.1 Características da população selecionada	55
5.1.2 Análise da expressão de IDO em espécimes humanas de CB	58
5.1.3 Correlação entre a expressão de IDO e os parâmetros patológicos	58
5.1.4 IDO vs. Sobrevida livre da doença	60
5.2 Fase 2: Efeito do BCG sobre a expressão de IDO1 no CB	61
5.2.1 Modelo <i>in vitro</i> para avaliação dos efeitos do BCG sobre a expressão de IDO1	61
5.2.1a Expressão de IDO em células humanas de CB incubadas com BCG	61
5.2.1b Expressão de IDO em células humanas de CB incubadas com BCG e células mononucleares	62
5.2.2 Modelo <i>in vivo</i> para avaliação dos efeitos do BCG sobre a expressão de IDO1	64
5.2.2a Análise da expressão da IDO em CB murino exposto ao BCG	64
5.2.2b Efeito do BCG sobre a sobrevida dos animais	67
5.2.2c Efeito do BCG sobre o crescimento tumoral	68
5.2.2d Efeito do BCG sobre o número de linfócitos T tumorais	68
5.3 Fase 3: Efeito dos inibidores da IDO sobre o CB	69
5.3.1 Análise <i>in vitro</i>	69
5.3.1a Comparação da expressão da IDO1 e suas vias em diferentes linhagens de CB	69
5.3.1b Efeito dos inibidores da IDO sobre a atividade e expressão de IDO1	70
5.3.1c Efeito dos inibidores da IDO sobre as vias de ativação da IDO1	72
5.3.2 Análise <i>in vivo</i>	74
5.3.2a Efeito do MT sobre a sobrevida	74
5.3.2b Efeito do MT sobre o volume tumoral	75
5.3.2c Efeito do MT sobre o número de linfócitos T tumorais	75

6 Discussão	77
7 Conclusões	83
8 Limitações do estudo.....	84
9 Referências Bibliográficas	86
10 Anexos	95
Anexo 1 - Resultados complementares.....	95
Estabelecimento da concentração de BCG a ser usada nas culturas.....	95
Validação da capacidade de endocitose do BCG sobre linhagem murina MB49	96

Lista de Tabelas

Tabela 1.....	54
Tabela 2.....	56
Tabela 3.....	57
Tabela 4.....	59
Tabela 5.....	59

Lista de Figuras

Figura 1.....	18
Figura 2.....	20
Figura 3.....	22
Figura 4.....	23
Figura 5.....	38
Figura 6.....	42
Figura 7.....	43
Figura 8.....	46
Figura 9.....	47
Figura 10.....	58
Figura 11.....	60
Figura 12.....	61
Figura 13.....	62
Figura 14.....	63
Figura 15.....	65
Figura 16.....	66
Figura 17.....	67
Figura 18.....	67
Figura 19.....	68

Figura 20.....	68
Figura 21.....	70
Figura 22.....	71
Figura 23.....	71
Figura 24.....	72
Figura 25.....	72
Figura 26.....	73
Figura 27.....	74
Figura 28.....	75
Figura 29.....	76
Figura 30.....	96
Figura 31.....	97
Figura 32.....	98

Lista de Abreviaturas

AHR – Receptor de Hidrocarboneto de Arila

ATCC – American Type Culture Collection

BCG - Bacilo Calmette-Guérin

CB – Câncer de Bexiga

cDNA – DNA complementar

DAB – diaminobenzidina

DNA – Ácido Desoxinucleico

EMT – Epithelial to Mesenchymal Transition

GCN2 – general control nonderepressible 2

IDO – Indoleamina 2,3-dioxigenase.

IL – Interleucina

IFN – Interfon

INCA - Instituto Nacional de Câncer

IFN- γ – Interferon Gama

Kyn – Quinurenina

MT – 1-metil-D-Triptofano

PBS – Tampão Fosfato-Salino

PCR – Reação de Cadeia de Polimerase

qRT-PCR – PCR quantitativo em tempo real

RNA – Ácido Ribonucleico

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

RTU - ressecção transuretral

SFB – Soro Fetal Bovino

TNM - Classificação de Tumores Malignos

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TRAIL – *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

TEM – Transição Epitélio Mesenquimal

NMI – Não Músculo Invasivo

MI – Músculo Invasivo

ITU – Infecções do Trato Urinário

MHC –Complexo principal de histocompatibilidade

mTor – mammalian Target of rapamycin

CYP1A1 – Citocromo P450, família 1, subfamília A, polipeptídeo 1

TGF- β –Fator de Transformação do Crescimento beta

Resumo

O câncer de bexiga (CB) apresenta alta taxa de recorrência e progressão mesmo após RTU associada à imunoterapia com BCG. A indoleamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO) é uma enzima imunomoduladora implicada no escape imunológico e progressão de diversos tipos de câncer, agindo por meio de vias de sinalização, tais como GCN2 (*general control nondrepressible 2*) e AHR (*aryl hydrocarbon receptor*). Por ser fortemente induzida por interferon-gama, uma citocina induzida por BCG, a IDO pode ser responsável por parte da progressão do CB após o tratamento convencional. A inibição da IDO torna-se atraente, porém o efeito dos inibidores sobre as suas vias no CB não é conhecido. Os objetivos foram: (i) verificar se a IDO está associada com a progressão do CB; (ii) verificar se o BCG induz IDO no CB; e (iii) verificar se dois inibidores usuais da IDO interferem nas vias GCN2 e AHR no CB.

Biópsias de 155 pacientes com CB foram selecionadas para o estudo, sendo 88 com CB não músculo-invasivo (NMI) e 67 com CB músculo-invasivo (MI). Imunohistoquímica para IDO foi realizada para correlacionar sua expressão com os dados clinicopatológicos adquiridos dos prontuários. O efeito do BCG sobre a expressão de IDO foi investigado em cultura de linhagens humanas de CB e em modelo *in vivo*, avaliando-a por meio de imunohistoquímica e PCR em tempo real. Os inibidores da IDO 1-metil-D-triptofano (MT) e INCB024360 (INCB) foram avaliados em cultura de células e o MT em modelo animal. A inibição da IDO foi aferida pela mensuração de L-quinurenina no sobrenadante e a ativação das vias GCN2 e AHR por meio de PCR em tempo real para CHOP e CYP1A1, respectivamente.

Como resultados, a expressão de IDO correlaciona-se positivamente com progressão do CB (grau e estágio). Já o uso de BCG não exerceu efeito sobre a expressão de IDO, tanto em cultura como em modelo animal. Os inibidores avaliados foram eficazes em inibir a IDO, porém o MT induziu a via AHR acionada pela IDO, como um agonista.

Como conclusão, (i) a IDO tem potencial para auxiliar no prognóstico do CB, pois associa-se com grau e estágio avançados de CB; (ii) o BCG não induz diretamente a expressão de IDO no CB, mantendo-se como um tratamento

adjuvante seguro; (iii) entre os dois inibidores da IDO avaliados, o INCB mostra-se promissor, enquanto o MT oferece risco por acionar a via AHR, uma via reconhecida como potencializadora de escape e progressão tumorais.

Palavras-chave: Indoleamina 2,3-dioxigenase 1, BCG, Receptor de hidrocarboneto de arila.

Abstract

Bladder cancer (BC) has a high rate of recurrence and progression even after TUR associated with BCG immunotherapy. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO) is an immunomodulatory enzyme implied in the immune escape and progression of several types of cancer, acting through signaling pathways, such as GCN2 (general control nonderepressible 2) and AHR (aryl hydrocarbon receptor). Because it is strongly induced by interferon-gamma, a BCG-induced cytokine, IDO may be responsible for part of the progression of BC after conventional treatment. The inhibition of IDO becomes attractive, but the effect of inhibitors over its pathways in BC is not known. The objectives were: (i) to verify if the IDO is associated with the progression of the BC; (ii) verify whether BCG induces IDO in the BC; and (iii) check if two usual IDO inhibitors interfere with the GCN2 and AHR pathways in the BC.

Biopsies from 155 patients with BC were selected for the study, 88 with non-muscle-invasive BC (NMI) and 67 with muscle-invasive BC (MI). Immunohistochemistry for IDO was performed to correlate its expression with clinicopathological data acquired from medical records. The effect of BCG on the expression of IDO was investigated in culture of human lines of BC and in vivo model, evaluating it by means of immunohistochemistry and real-time PCR. Inhibitors of IDO 1-methyl-D-tryptophan (MT) and INCB024360 (INCB) were evaluated in cell culture and MT in animal model. The inhibition of IDO was measured by measuring L-quinurenine in the supernatant and the activation of the GCN2 and AHR pathways by real-time PCR for CHOP and CYP1A1, respectively.

As a result, the expression of IDO correlates positively with the progression of the BC (grade and stage). The use of BCG had no effect on the expression of IDO, either in culture or in animal model. The evaluated inhibitors were effective in inhibiting IDO, but MT induced the AHR pathway triggered by IDO, as an agonist.

In conclusion, (i) the IDO has the potential to assist in the prognosis of BC, as it is associated with advanced degree and stage of BC; (ii) BCG does not directly induce the expression of IDO in BC, remaining as a safe adjuvant treatment; (iii)

between the two IDO inhibitors evaluated, the INCB is promising, while MT offers risk for activating the AHR pathway, a pathway recognized as a potential for tumor escape and progression.

Keywords: Indoleamine 2,3-dioxygenase 1, BCG, Aryl hydrocarbon receptor.

1 Introdução

1.1 Câncer no mundo

O mais recente estudo global de câncer no mundo estima cerca de 18,1 milhões de novos casos de câncer e 9,6 milhões de mortes pela mesma causa em 2018¹. O câncer é uma causa preocupante de morbidade e mortalidade em todo o mundo, independente de região, índice de desenvolvimento humano (IDH) e sexo. Em todo o mundo, estima-se que 1 em 8 homens e 1 em 10 mulheres desenvolverão alguma forma da doença ao longo da vida¹.

1.2 Câncer de Bexiga (CB)

O câncer de bexiga (CB) é o décimo tipo mais comum de câncer no mundo, com uma estimativa de cerca de 549 mil novos casos e 200 mil mortes por ano. Esta doença apresenta maior incidência em homens do que em mulheres. Em homens, as taxas de incidência e mortalidade correspondem a 9,6 e 3,2/100.000 habitantes, respectivamente, e correspondem a uma taxa cerca de 3 vezes maior do que a observada em mulheres¹.

No Brasil, segundo dados do INCA, em 2020, são estimados 10.640 novos casos, sendo 7.590 em homens e 3.050 em mulheres. Foram também registradas 4355 mortes em 2017, sendo 3021 homens e 1334 mulheres²

1.3 Principais fatores de risco do CB

Diferentes fatores são apontados como importantes no risco de surgimento do CB. O tabagismo é estabelecido como o maior fator de risco associado à doença. Seu impacto é observado também como responsável pelo aumento no número de casos de CB também em mulheres nos últimos anos¹.

É importante notar que até 90% dos casos ocorre acima dos 55 anos, com 2 vezes maior incidência sobre caucasianos², além de exigir observação e atenção especial em indivíduos com histórico familiar já positivo para CB.

Além disso, infecções crônicas do trato urinário (ITU), baixa ingestão de água, exposição a determinados produtos químicos, quimio e radioterapias apresentam-se como fatores de risco também associados ao surgimento do CB^{3, 4}.

1.4 Abordagens terapêuticas convencionais

A citoscopia é considerada o método padrão para diagnóstico e acompanhamento do CB, porém a falha na detecção de aproximadamente 25% nos tumores de pequenas dimensões e do carcinoma *in situ*, e a baixa sensibilidade, são fatores limitantes em sua utilização^{5,6}.

A ressecção transuretral (RTU) consiste na metodologia padrão para tratamento de tumores superficiais e é por vezes associada à quimioterapia intravesical com o uso de mitomicina. No entanto, nos casos de tumores recorrentes e de evolução invasiva (representados por tumores estágio T1, Cis

ou alto grau), recomenda-se a imunoterapia adjuvante com BCG (Bacilo Calmette-Guérin), apresentando significativa redução nas taxas de recorrência⁷.

Nos casos de tumores recidivados e refratários à terapia intravesical, indica-se cistectomia radical, metodologia também aplicada em tumores invasivos já na apresentação inicial. Nestes casos, é associada ao procedimento de linfadenectomia.

Embora a terapia adjuvante com BCG tenha mostrado eficácia, 30 a 50% dos pacientes não respondem ao tratamento, possuindo alto risco de recorrência e progressão da doença⁸⁻¹².

Diante de tal cenário, é de fundamental importância a busca e validação de marcadores diferenciais com a capacidade de identificar possíveis pacientes não responsivos à terapia com BCG, assim como a identificação de potenciais tumores com caráter resistente/sensíveis aos quimioterápicos, possibilitando a aplicação de terapias de maior intensidade, melhorando assim a qualidade de vida do paciente ao postergar ou mesmo evitar a necessidade de manobras de cistectomia radical¹³.

1.5 BCG e CB

O tratamento com BCG consiste na aplicação de uma cepa viva atenuada de bactérias *Mycobacterium bovis* diretamente no local do tumor com ciclos repetidos após a RTU¹⁴. Seus mecanismos imunológicos como terapia anticâncer não estão totalmente elucidados, porém o bacilo pode exercer sua ação por meio da citotoxicidade direta sobre células uroteliais e tumorais,

promovendo a ativação do sistema imune e liberação de diversas citocinas (Figura 1).

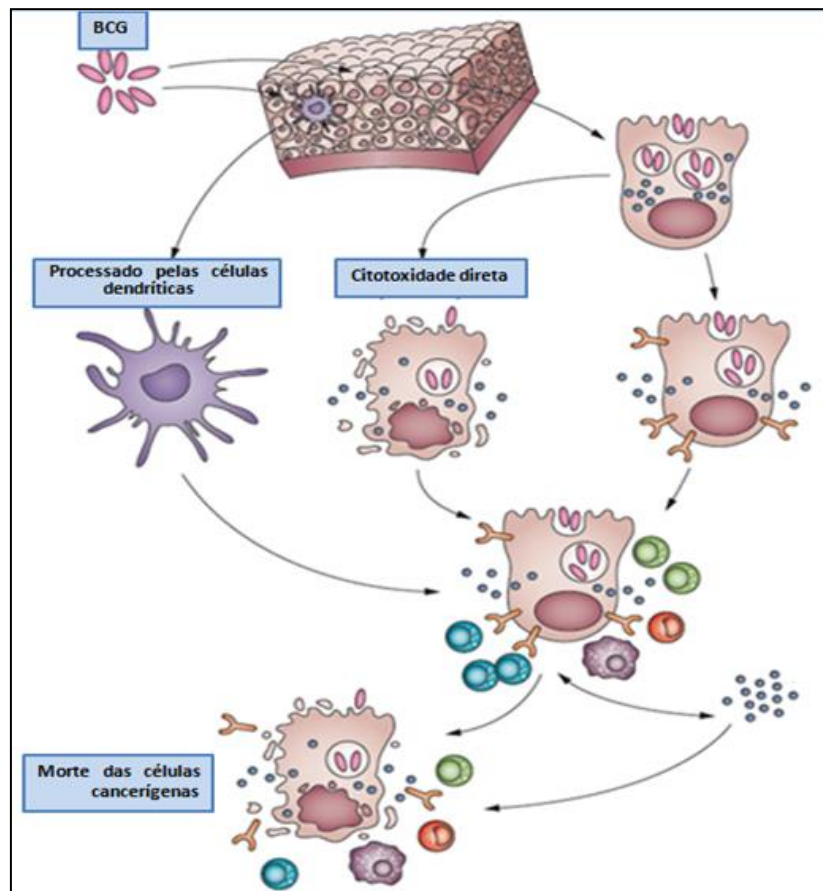


Figura 1. Mecanismo de toxicidade direta do BCG. O mecanismo conhecido propõe a ação do bacilo sobre células tumorais por meio de toxicidade direta, levando à apoptose de células tumorais e liberação de fatores pró-inflamatórios, bem como o acionamento e recrutamento de células imunes ao local, possibilitando a localização e eliminação de células tumorais remanescentes. (retirado de: Redelman-Sidi, G. et al. Nat. Rev. Urol. 11, 153¹⁵).

Diversos estudos demonstraram que a infusão endovenosa de BCG em camundongos promove resistência ao transplante tumoral¹⁶, além de promover a elevação da concentração plasmática do TNF¹⁷.

As bactérias internalizadas pelas células neoplásicas facilitam o processo de apresentação antigênica em associação com moléculas do MHC de classe II¹⁷, desencadeando a produção de citocinas como IFN- γ ¹⁸, TNF¹⁹ e interleucinas 1, 2, 6 e 8^{19,20}, além da interleucina-17, indutora do perfil TH1²¹. Contudo, apesar de eficaz, há dentre os pacientes a presença de recidivas e/ou progressão tumoral. Tais achados ainda não apresentam informações suficientes para elaboração de suas causas. Interleucinas, TRAIL (do inglês, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*), TP53, Ki-67, retinoblastoma e polimorfismos têm sido envolvidos na tentativa de predição da resposta do CB à terapia com BCG^{11,22-24}. Contudo, estes marcadores não são eficazes.

1.6A Indoleamina 2,3-dioxigenase 1

A indoleamina 2,3-dioxigenase1 (IDO) é uma hemeproteína monomérica que foi descrita pela primeira vez na década de 60²⁵. É responsável pelo consumo do aminoácido essencial triptofano e formação de catabólitos reconhecidos como derivados da quinurenina²⁶. Sua estrutura terciária, descrita em 2006, é caracterizada pela presença de dois domínios, um maior e outro menor, unidos por um grupo heme(Figura 2)²⁷.

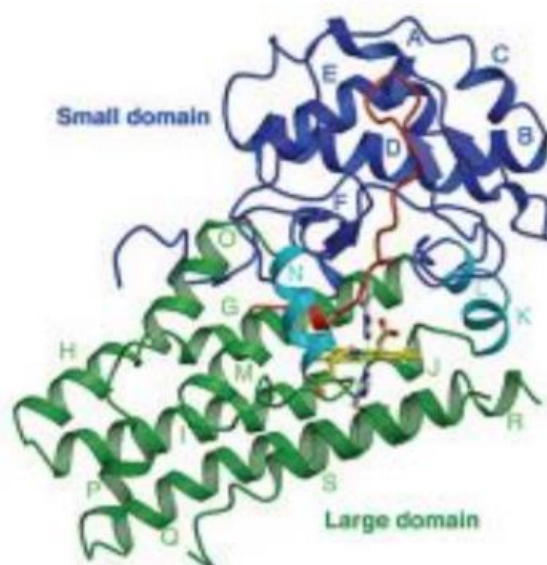


Figura 2. Representação da estrutura terciária da IDO, demonstrando conformação de seu domínio menor (Azul) e maior (Verde). Em azul claro pode ser visualizada sua cadeia de ligação, seguida de um *loop* de conexão entre os dois domínios (vermelho). Finalmente, é possível observar em amarelo a localização de seu grupo heme, caracterizando-a como uma hemeproteína. (Retirado de: Sugimoto et. al, 2006²⁷).

Seu papel passou a ganhar maior destaque quando Munn e colaboradores demonstraram, em 1998, seu importante papel na proteção embrionária, onde a ação da IDO na depleção de triptofano mostrou-se capaz de sensibilizar a ação de linfócitos T e células *Natural Killer*, com posterior anergia e apoptose²⁸.

Devido ao fato de a IDO ser expressa constitutivamente em diversos tecidos humanos, como intestino, timo, placenta, dentre outros, seu papel começou a ser melhor elucidado do ponto de vista fisiológico. Na placenta, por exemplo, esse mecanismo imunológico é acionado naturalmente como meio de fornecer ao feto, semi-alógeno, proteção contra o sistema imune materno, diminuindo as chances de rejeição do mesmo²⁸. Essa ação foi demonstrada em

camundongos, onde o uso de 1-Metil-D-triptofano (MT), hoje um inibidor clássico da IDO, levou à rejeição dos embriões²⁸.

Entretanto, anos depois, Terness e colaboradores demonstraram que a imunomodulação local não se dá somente pela depleção de triptofano, mas também pela ação dos derivados da quinurenina²⁵. Tais compostos possuem efeitos diretos sobre células imunes, promovendo, também, sua anergia e apoptose²⁵.

Dentre seus demais papéis fisiológicos, foi também relacionada à proteção do organismo contra a invasão e disseminação microparasitária²⁹, tornando o ambiente desfavorável à proliferação de microrganismos também pela depleção de triptofano intersticial. Assim, a IDO demonstra seu papel em ações pontuais e precisas do organismo não só na proteção fisiológica do organismo contra reações imunes não desejadas, mas também na proteção contra agentes externos²⁹.

A imagem a seguir ilustra de maneira breve o mecanismo de sinalização da IDO (induzida também por citocinas de perfil pró-inflamatório, como o IFN- γ) e seu mecanismo de catabolização do triptofano (Figura 3)³⁰.

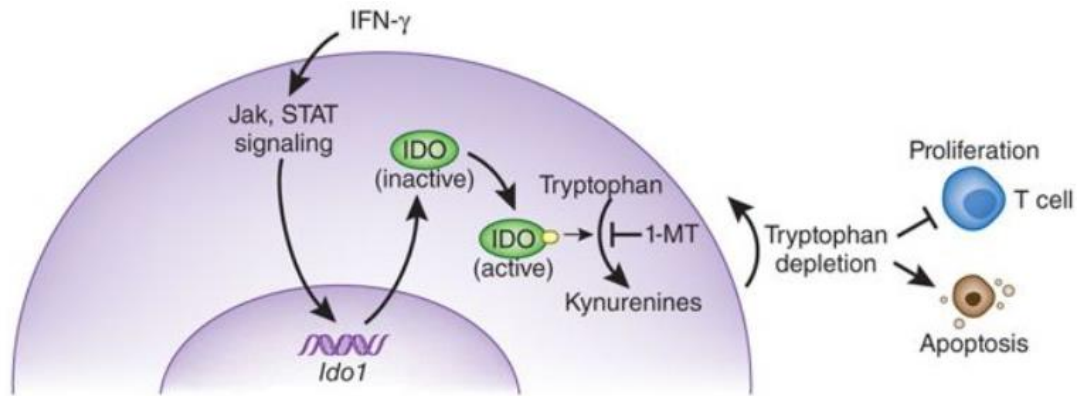


Figura 3. Mecanismo de sinalização de indução da expressão daIDO mediada por IFN- γ . A imagem mostra também a captação do triptofano e ativação da via das quinureninas, promovendo efeitos diretos sobre ação e viabilidade linfocitária. Retirado de: CHEN, WanJun. IDO, More than an enzyme. *Nature immunology*, 2011³⁰.

1.6.1 Principais vias acionadas pela IDO

Os mecanismos de ativação e regulação da IDO são descritos classicamente pela sua interação em três vias de ação, sendo elas a via quinase GCN2, a via mTor e, finalmente, a ativação de receptores de hidrocarboneto de arila (AHR).

A mTor (do inglês *mammalian target of rapamycin kinase*) é utilizada em processos fundamentais para a manutenção da homeostasia tecidual³¹. Seu funcionamento é dependente da disponibilidade de triptofano, portanto, a produção de IDO leva à inibição da fosforilação da mTOR, processo que é revertido pela adição de triptofano³².

As duas vias remanescentes, GCN2 e AHR possuem também forte relação com a depleção de triptofano ou as ações dos subprodutos gerados

pela ação da IDO. Sua investigação, por meio do rastreamento de seus marcadores de ativação, CHOP (para GCN2) e CYP1A1 (para AHR) foi foco dos estudos desenvolvidos nesta tese. A figura 4 sumariza a interação dessas duas vias com a IDO, com suas ações sendo melhor descritas nos próximos tópicos.

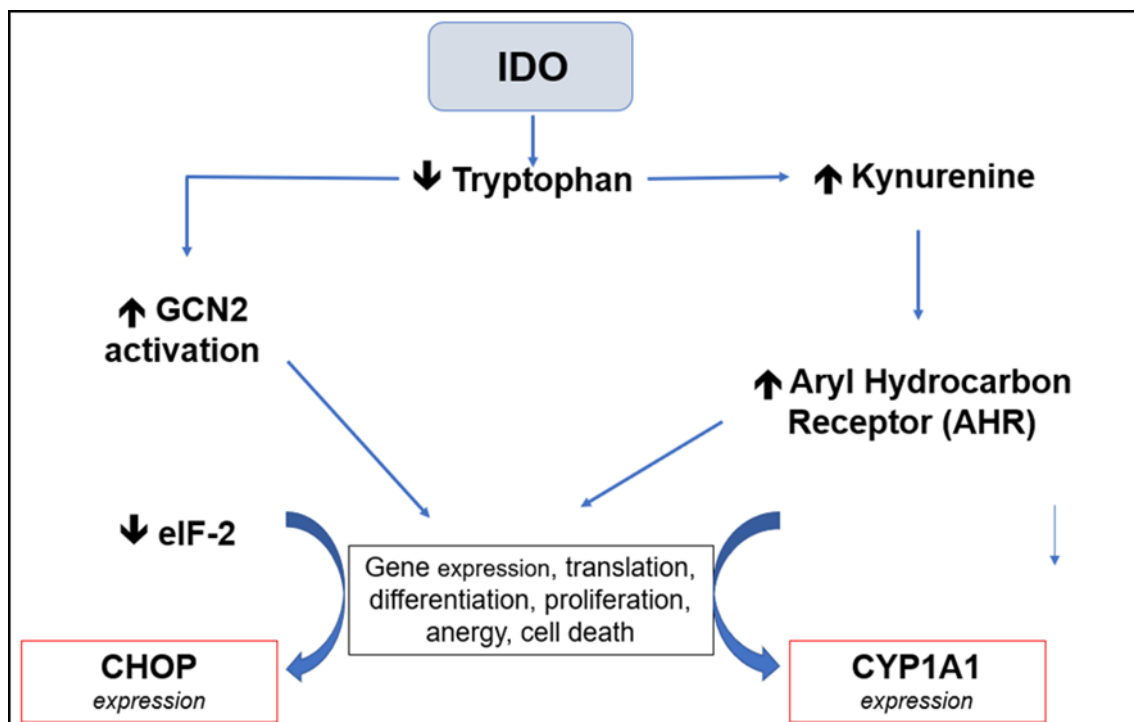


Figura 4. Revisão do mecanismo de depleção do triptofano mediado pela ação da IDO e sua interação com as vias GCN2 e AHR (Baseado em: Cancer Immunol Immunother. 2014³³).

1.6.1a Via GCN2

Há indícios de que a depleção de triptofano via IDO acione a via da quinase GCN2 (*General Control Non-Derepressible 2*), um mecanismo importante acionado pela depleção dos níveis de determinados aminoácidos no

sistema, como o triptofano e atua limitando a produção proteica e proliferativa das células^{34,35}.

Evidências apontam que essa via é fundamental para a indução de processos que levam à anergia de linfócitos T via IDO³⁶, além de induzir a diferenciação de linfócitos T reguladores^{37,38}.

Em condições normais, a primeira etapa para iniciar uma tradução é a formação de um complexo formado pela eIF-2 (constituída por três subunidades), GTP e o RNA transportador (RNAt) carregado com metionina.

Essa é uma maneira de preservar recursos e limitar a divisão celular sob condições adversas. Nesta condição, há excesso de RNAt desprovido de aminoácido, o RNAt liga-se a uma região regulatória na GCN2 quinase, promovendo a fosforilação da eIF-2 α . Quando a subunidade alfa do eIF-2 é fosforilada no resíduo serina 51, inibe a atividade de eIF-2B na troca do GDP pelo GTP, inibindo a formação do complexo eIF-2/GTP/RNAt^{34,35}. À medida que a GCN2 é ativada pelos RNAt não carregados, ela dispara vias de sinalização que podem controlar o ciclo celular, apoptose e diferenciação celular, a depender do tipo celular³⁹⁻⁴¹.

O rastreamento da atividade da GCN2 não é realizado de modo direto. Em 2005, Munn e colaboradores identificaram possíveis marcadores da atividade da GCN2 em células. Dentre os potenciais alvos, foi verificada que a expressão do gene CHOP (também chamado de gadd153), o aumento de sua expressão é diretamente ligado à ativação da via GCN2 frente à depleção de aminoácidos³⁶.

Foi demonstrado que a IDO induz a diferenciação de linfócitos T reguladores em doença autoimune via GNC2^{37,38}. Forouzandeh e colaboradores⁴² demonstraram que a resposta à depleção de triptofano induzida pela IDO afeta mais pronunciadamente linfócitos T CD8 do que CD4 e isso se deve ao diferente acionamento da via GCN2⁴². O mesmo grupo comparou a via da GCN2 quinase em linfócitos T e células de pele e observaram que a resistência que fibroblastos e queratinócitos possuem em comparação aos linfócitos T se deve a via GCN2⁴³. Assim, por conta de tumores de bexiga expressarem IDO, levantamos a hipótese de que a GCN2 quinase poderia estar sendo ativada nesses tumores e, desta maneira, poderia estar influenciando o comportamento celular.

1.6.1b Via AHR

O receptor de hidrocarboneto de arila (AHR, do inglês *aryl hydrocarbon receptor*) é um fator de transcrição acionado através da ação de L-quinurenina e seus derivados. A L-quinurenina liga-se ao AHR, induzindo a expressão de genes que controlam o sistema imune, incluindo o aumento de IDO em células dendríticas⁴⁴.

Esta via de “mão dupla” levou à hipótese de que a expressão de IDO possa ser mantida constitutivamente por meio de sua relação com o AHR. Litzemberger e colaboradores⁴⁵ demonstraram que células neoplásicas que expressam IDO constitutivamente acionam o AHR que por sua vez induz a via STAT-3-IL-6 que aumenta a expressão de IDO, estabelecendo-se um mecanismo autócrino de sustentação da expressão de IDO⁴⁵.

Opitz e colaboradores demonstraram que a L-quinurenina produzida pela TDO (do inglês tryptophan-2,3-dioxygenase), a isoforma constitutiva no controle plasmático do triptofano e que também é expressa em alguns tumores, aciona o AHR em tumor cerebral sendo um mecanismo para a imunossupressão antitumoral⁴⁶. Não só a L-quinurenina, mas também seus derivados podem acionar o AHR, como o ácido quinurênico, promovendo aumento de IL-6 via AHR como um mecanismo anti-inflamatório⁴⁷.

A ativação do receptor citosólico AHR por seus substratos leva à translocação de seu complexo para o núcleo, onde há formação de um dímero, ativando a transcrição de fatores como o citocromo P450 CYP1A1, que pode, então, ser utilizado como um marcador sensível da ativação do AHR⁴⁸.

Pelo fato de o AHR ser apontado como um mediador da sobrevivência e motilidade de células de glioblastoma^{46,49}, é provável que esteja envolvido 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)⁵⁰. Além disso, a invasividade de células de carcinoma renal é controlada pelo AHR⁵¹. Camundongos transgênicos para ativação permanente de AHR desenvolvem tumor de estômago espontaneamente⁵¹. Desta maneira, aIDO 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.

1.6.2IDO e câncer

Estudos têm demonstrado a expressão de IDO em alguns tipos de câncer, apontando a enzima como um fator protetor por garantir “escape imunológico”, ou seja, aquisição de tolerância imunológica ao tecido neoplásico⁵².

Em camundongos pré-imunizados, a expressão de IDO foi capaz de conferir proteção às células neoplásicas infundidas, sendo perdida a partir da inibição química da IDO com o MT⁵³. Camundongos nocauteados para o gene Bin1 demonstraram elevação tumoral da expressão de IDO, sugerindo que esta encontra-se sob o controle deste gene⁵⁴. A inibição da IDO potencializa o efeito de quimioterápicos contra os tumores⁵⁴. Este efeito é perdido quando se trata de camundongos imunodeficientes ou com depleção de linfócitos T CD4+ e T CD8+, sugerindo a presença de um fator protetor relacionado à sua imunomodulação⁵⁴. A expressão de Bin1 é inibida em neoplasias humanas de diversos tecidos como mama, próstata, pulmões, cólon, sistema nervoso e pele⁵⁵⁻⁵⁹, indicando a possível participação da IDO neste processo.

A associação do papel da IDO em tumores começou a ser explorada após a descoberta de seus mecanismos imunomoduladores. Em 2003, Uyttenhove e colaboradores caracterizaram a presença de IDO em tumores de diversos tecidos tumorais humanos, entre eles em CB⁵³.

A expressão de IDO “*in situ*” correlaciona-se com progressão de câncer endometrial, funcionando como marcador para piora do prognóstico clínico⁵⁹. Na mesma linha de estudo, a expressão de IDO encontra-se relacionada com diminuição da sobrevida e pior prognóstico para portadores de câncer

ovariano⁶¹. Sua expressão também está presente em câncer coloretal, sendo relacionada à metástase hepática⁶¹, embora efeito semelhante tenha sido descrito em carcinoma hepatocelular⁶², um estudo com cocultura de células mononucleares de sangue periférico e células de carcinoma hepatocelular demonstrou papel importante da IDO para a atividade imune anticâncer⁶³. Este efeito contraditório foi também demonstrado em carcinoma renal, onde detectou-se a expressão de IDO em células endoteliais de vasos tumorais, correlacionando-se com maior sobrevida dos pacientes⁶⁴. A IDO parece exercer efeitos paradoxais dependentes do tipo de tecido neoplásico.

Um estudo envolvendo pacientes com câncer e hiperplasia da próstata, demonstrou que a expressão de IDO é significativamente maior nos tumores em relação ao tecido hiperplásico, sendo apontada como atraente marcador para este tipo de neoplasia⁶⁵.

Recentemente, estudos em camundongos com a combinação do uso de MT e melatonina associados à vacina anti-HPV mostrou efeitos positivos no tratamento de tumores associados ao HPV (papiloma vírus humano). Esses dados mostram que o uso isolado do MT também pode levar a um aumento do volume tumoral, sendo necessários cuidados e administração da droga apenas em associação com os demais compostos no tipo de tumor estudado⁶⁶.

Nos últimos anos, estudos demonstraram que a expressão de IDO correlaciona-se com progressão de CB, classificação histológica, grau e estágio TNM, além de ser observada em tumores de pacientes com menor sobrevida⁶⁷. Sua expressão também foi associada um pior prognóstico em casos com alta expressão da enzima em fases iniciais e em tumores ainda em estágio não-musculoinvasivos^{68,69}.

Nosso grupo demonstrou que células T24 (linhagem humana de carcinoma de células transicionais de bexiga) expressam constitutivamente IDO e que sua inibição pode ser induzida por TGF- β ⁶⁹. Além de estar envolvida na tolerância imunológica, é possível que a IDO participe da fisiopatologia do CB através de mecanismos não imunológicos. Foi demonstrado que a expressão de IDO correlaciona-se com mediadores de transição epitélio-mesenquimal e seu tratamento com metil-triptofano (MT; inibidor da IDO) é capaz de intensificar o processo⁶⁹.

Essa hipótese parece ter sido confirmada recentemente, onde dados mostram que o papel da enzima apresenta não só efeitos imunomoduladores benéficos ao tumor, como também pode promover a ativação de mecanismos de progressão e metástase, como a ativação de processos de transição epitélio-mesenquimal (TEM) por meio da ativação da via IL-6/STAT3/PD-L1⁷⁰.

Estudos clínicos de fases 3 e pré-clínicos vêm sendo realizados associando não só o uso de inibidores de IDO, como também outras terapias auxiliarem em combinação como meio de diminuir as taxas de recidiva e progressão tumorais⁷¹.

1.7 IDO e BCG

O IFN-gama é considerado o maior indutor da expressão de IDO e, por este motivo, foi postulada uma relação direta entre IDO e BCG, uma vez que a exposição ao BCG induz fortemente a produção de IFN-gama, tanto por células imunes como não-imunes.

Embora não haja estudos que demonstrem a ligação existente entreIDO e BCG em tumores, existem fortes evidências desta ligação no contexto da expressão. Estudos com animais têm demonstrado que a administração de BCG em camundongos promove aumento significativo de IFN- γ , tanto local como sistêmico, elevando a expressão de IDO no sistema nervoso central. Tal aumento promove a depleção de triptofano, substrato essencial para a síntese de serotonina, favorecendo um quadro de depressão⁷²⁻⁷⁶. Além disso, o aumento da atividade de IDO induzida por vacinação com um antígeno específico da *Mycobacterium tuberculosis*, denominado 85A, correlacionou-se positivamente ao aumento de IFN- γ plasmático nos pacientes vacinados⁷⁷.

O efeito da IDO na modulação e na previsão de resposta ao BCG (tratamento convencional que consiste na aplicação de uma cepa viva, atenuada de bactérias *Mycobacterium bovis* diretamente no local do tumor com ciclos repetidos após a ressecção transuretral do tumor vesical não foi ainda demonstrado, porém profissionais da área tem levantado esta hipótese em revisão da Nature Review Urology 2015⁷⁸, onde a associação do inibidor da IDO indoximod (MT) com BCG é sugerida, uma vez que o indoximod tem sido utilizado para outros tipos de câncer como por exemplo o de próstata⁷⁸.

1.8 Inibidores da IDO e câncer

A proposta de utilização de inibidores da IDO em diversos tipos de câncer vêm ganhando maior espaço nas propostas atuais de ensaios clínicos. Em uma rápida pesquisa, pelo website clinicaltrials.gov/⁷⁹, podemos encontrar 34 estudos clínicos realizados ou em andamento com diferentes inibidores e

para diversos tipos de câncer, mostrando uma crescente preocupação entre pesquisadores ao redor do mundo na modulação da IDO como fonte de tratamento. Destes, apenas um deles apresenta ensaios realizados especificamente com tumores de bexiga. Com base nos principais inibidores escolhidos para ensaios clínicos em andamento, dois deles mostraram um potencial de interesse para seu uso para responder os objetivos deste trabalho, sendo apresentados a seguir com maiores detalhes.

1.8.11-Metil-D-Triptofano (MT)

O MT, um inibidor competitivo da IDO, atua competindo com o triptofano pelos sítios de ligação com a IDO, desta maneira, diminui então, a formação dos compostos de quinureninas e derivados, além de prevenir a depleção do triptofano, aminoácido essencial. Ambas as ações têm potencial para garantir a inibição da ação da IDO sobre estes dois fatores, podendo auxiliar no combate ao escape imunológico fornecido ao tumor pela enzima⁷¹. Atualmente, foram realizados/estão em andamento 6 ensaios clínicos registrados pelo clinicaltrials.gov buscando seu uso também associado a tratamentos convencionais.

Nos últimos anos, porém, o uso de MT vêm sendo associado ao acionamento de AHR, indicando também, que apesar de sua ação prevenindo a depleção do triptofano, pode ligar-se de maneira inespecífica nos mesmos alvos procurados pelas quinureninas, exercendo, portanto, o desencadeamento de vias com papel linfotóxico e potencialmente prejudicial na resposta imune do paciente ao tumor⁸⁰.

Embora haja uma controvérsia sobre o papel do IDO no câncer, moléculas que podem modular as vias mediadas pelo IDO têm sido vistas como promissoras para o tratamento do câncer. Neste contexto, o MT, tem sido intensamente estudado como um agente anticancerígeno. Atualmente, sua associação com docetaxel foi usada em um ensaio clínico de fase I com pacientes com tumores sólidos metastáticos⁸¹.

Nosso grupo demonstrou que células T24 (linhagem humana de carcinoma de células transicionais de bexiga) expressam constitutivamente IDO e que sua inibição pode ser induzida por TGF- β ⁶⁹. Além de estar envolvida à tolerância imunológica, é possível que a IDO participe da fisiopatologia do CB através de mecanismos não imunológicos. Foi demonstrado que a expressão de IDO correlaciona-se com mediadores de transição epitélio-mesenquimal e seu tratamento com metil-triptofano (MT; inibidor da IDO) associado de TGF- β aumentam a capacidade migratória e de invasão das células T24 e diminui a expressão de IDO⁶⁹.

1.8.2 INCB 024360

Dos já citados ensaios com inibidores da IDO, 9 destes correspondem ao uso de outro composto, o Epcadostat (INCB024360) e seus análogos. Este inibidor apresenta-se como uma proposta de um potente e específico inibidor da IDO com bons resultados em modelos in vivo de melanoma⁸².

Estudos pré-clínicos detalhados mostraram que o INCB024360 atua como um inibidor competitivo da triptofano da atividade catabólica da IDO1

humana em ensaios baseados em células ($IC_{50} = 12 \text{ nmol / L}$) com seletividade 100 vezes maior que a exibida para IDO2 e TDO2.

A administração de INCB024360 em camundongos singênicos inibiu os níveis de quinurenina em aproximadamente 90% no plasma e no tumor e reduziu o crescimento do tumor em camundongos imunocompetentes, mas não em imunocomprometidos, confirmando que a eficácia do medicamento depende da imunidade funcional. Além disso, no modelo de melanoma B16, o INCB024360 aumentou os efeitos antitumorais dos anticorpos anti-CTLA4 ou anti-PD-L1, onde a produção aumentada de IL2 e a proliferação de células T CD8 + sugeriam atividade mais pronunciada das células T⁸³.

Estudos preliminares dos primeiros relatos dos resultados da combinação do INCB024360 com os anticorpos anti-PD1 em melanoma, câncer de cabeça e pescoço, pulmão, rim e urotelial⁸⁴. No melanoma, as combinações de anti-PD-1 (pembrolizumabe ou nivolumabe) mostram taxas de resposta geral e controle da doença semelhantes às produzidas pela combinação aprovada de anticorpos PD-1 e CTLA-4 (ipilimumabe), mas sem o alto grau de efeitos colaterais autoimunes da combinação desses anticorpos^{85,86}.

No câncer de cabeça e pescoço, dados preliminares de 38 pacientes pré-tratados intensamente sugerem que o INCB024360 poderia aumentar as taxas de resposta geral e controle da doença quando administrado com anti-PD-1, de maneira independente dos níveis de PD-L1 ou do status do HPV, também sem qualquer aumento notável dos efeitos colaterais. Com base nesses resultados, o desenvolvimento clínico do INCB024360 avançou em um total de 14 tipos de tumores, sendo co-administrado com anticorpos anti-PD-1

(nivolumabe ou pembrolizumabe) ou anti-anticorpos PD-L1 (atezolizumabe e durvalumabe)⁸⁷.

Um estudo de fase III em melanoma para a combinação com pembrolizuma, entretanto, foi suspenso após resultados preliminares não demonstrando diferenças em relação à sobrevida livre a doença em comparação com tratamento realizado apenas com anticorpos anti-PD1⁸⁷.

Ademais aos possíveis efeitos benéficos que podem advir da associação desse novo inibidor da IDO, estudos também são realizados para a criação e aplicação também de análogos do *INCB024360*. Após o teste e refino de vários análogos por meio da modificação de suas estruturas radicais e funcionais é possível melhorar a solubilidade e biodisponibilidade do fármaco, além de melhor especificidade da ação inibitória (diminuindo sua afinidade cruzada para a enzima TDO) obtendo compostos com melhor otimização e potencial de uso clínico, como o composto *Incb024360-Analog 5L*⁸²(INCB), composto utilizado nos experimentos realizados nesta tese.

2 Justificativa

Procedimentos imunoterápicos desenvolvidos na rotina de tratamento de CB não invasivos, como o uso de BCG, apresentam benefícios ao quadro de uma parcela consideráveis de pacientes, entretanto, por mecanismos não ainda elucidados ainda apresentam uma alta taxa de recidiva e progressão nos anos pós-tratamento.

A interação desses fatores abordados (IDO e BCG), podem estar em ligação, visto que mecanismos desenvolvidos pela ação do bacilo para a ativação imune são os mesmos responsáveis por possibilitar a produção de uma maquinaria de citocinas responsáveis por promover a indução de IDO, molécula que vêm sendo fortemente ligada a progressão de diversos tumores e, mais recentemente, também ao CB.

Assim, levanta-se a hipótese de o BCG, enquanto realiza seu papel já estabelecido, estaria também induzindo a seleção ou desenvolvimento de células tumorais remanescentes com alta expressão de IDO, que seriam então responsáveis por um pior prognóstico e desfecho para o paciente à longo prazo.

É importante também realizar uma investigação mais profunda em relação às abordagens tomadas para o manejo da expressão de IDO nos ensaios clínicos que já seguem em curso. A melhor compreensão da interação de seus diferentes bloqueadores com as vias da IDO podem auxiliar a estabelecer os melhores candidatos para aplicação direta desse procedimento em rotina clínica, sem efeitos inespecíficos ou inesperados.

3 Objetivos

Objetivo central do presente estudo foi descrever o papel da IDO no CB.

Mais especificamente,

- 1) No contexto prognóstico, analisar a expressão de IDO em espécimes de CB e correlacioná-la com estadio, grau, progressão, recidiva e sobrevida de pacientes com CB;
- 2) No contexto terapêutico, verificar se o tratamento com BCG induz a expressão de IDO no CB, conferindo um risco para a progressão do CB;
- 3) No contexto terapêutico, verificar se dois inibidores seletivos da IDO atualmente testados no tratamento de outros tipos de câncer inibem a IDO no CB, bem como suas vias, buscando a melhor opção para abordagens futuras.

4 Materiais e métodos

4.1 Fase 1: Avaliação da IDO em espécimes humanas de CB

4.1.1 Casuística

Foram selecionados casos de carcinoma não músculo-invasivo (NMI) (estadiamento Ta - Carcinoma papilífero não invasivo, Tis - carcinoma *in situ* ou T1 - tumor que invade o tecido conjuntivo subepitelial) e músculo-invasivo (MI) (estadiamento >T2) do Hospital Euryclides Jesus Zerbini, a partir de análise de prontuário. Os fatores de exclusão foram: uso de radioterapia ou quimioterapia sistêmica adjuvante à cirurgia, uso de mitomicina no intraoperatório, indisponibilidade do bloco de parafina e ausência de dados clínicos e anatomopatológico do prontuário. Assim, foram selecionados **88** casos de **NMI** e **67** casos de **MI**. Os blocos de parafina contendo os espécimes cirúrgicos de ressecção endoscópica foram obtidos no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Euryclides Jesus Zerbini, em conjunto com os dados clínicos e análise anatomopatológica. Não houve necessidade de consulta específica para o projeto, bem como convocação de pacientes para aquisição de dados, visto que foram utilizados apenas espécimes já colhidos e histórico de prontuário.

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Nove de Julho e pelo CEP do Hospital Brigadeiro, sob número: CAAE: 49446515.0.0000.5511.

4.1.2 Elaboração e confecção do *Tissue Micro Array* (TMA)

A construção de blocos de TMA foi realizada a fim de obter maior otimização e garantir a presença de regiões adequadamente representativas dos tumores de interesse. A seleção da região tumoral foi realizada pela patologista Kátia Ramos Moreira Leite e a confecção do bloco de TMA feita pelo serviço de patologia da Fundação Faculdade de Medicina da USP.

Três fragmentos de cada paciente foram coletados e organizados em novos blocos de parafina contendo um total de no máximo 120 fragmentos (até 40 pacientes) cada. Estes foram devidamente cortados em espessura de 3–4 μ m e fixados em lâminas previamente silanizadas para imuno-histoquímica (Figura 5).

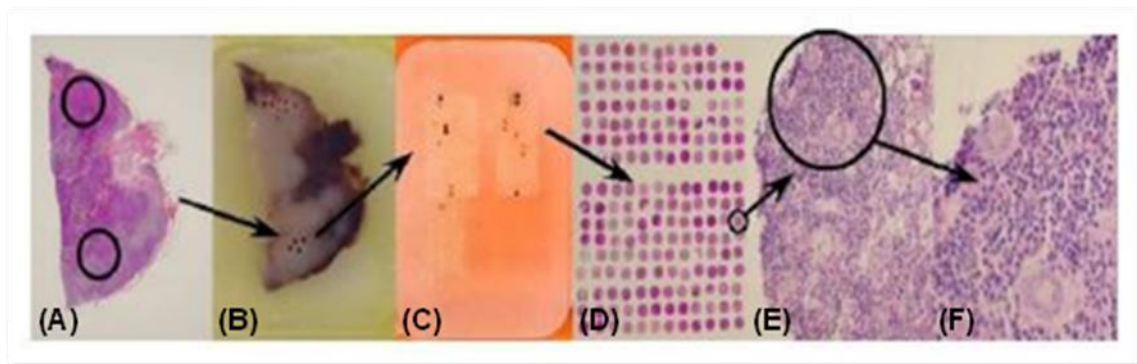


Figura 5. Etapas da construção dos blocos e lâminas de TMA. Foram selecionadas áreas representativas das biópsias de tumor (A) a partir de coloração HE. Três amostras de cada paciente foram coletadas (B). As amostras foram incluídas em um único bloco de parafina, com até 58 pacientes por bloco de arranjo (C). Na figura (D), é possível observar corte seriado com coloração histológica (hematoxilina) para visualizar os tumores em microscópio óptico convencional em ampliação de 100X (E) e 400X (F).

4.1.3 Imunohistoquímica para IDO em espécimes de CB humano

Para o processo de desparafinização, as lâminas foram mantidas por 30 minutos em estufa à temperatura de 60°C. Em seguida, as lâminas passaram por baterias de banhos, sendo 3 fases de xilol absoluto por 9 minutos cada, seguidas de 2 banhos em álcool etílico absoluto por 5 minutos e, por fim, 2 banhos em álcool etílico 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 panela à vapor, em tampão básico EDTA por 30 minutos, para aumentar a exposição antigênica. A seguir, as lâminas foram mantidas em solução de bloqueio de peroxidase endógena, composta por 70% de metanol, 20% água destilada e 10% peróxido de hidrogênio 30% (concentração final de peróxido 3%), protegidas da luz, por 30 minutos. Após lavagem em PBS, as bordas da região contendo as amostras foram margeadas com uso de PapPen (Sigma-Aldrich), a fim de garantir o contato dos reagentes posteriores com as amostras de interesse.

Para o bloqueio de ligações inespecíficas, as amostras foram incubadas com 6% de leite reidratado (Nestlé Brasil LTDA, São Paulo, Brasil) e albumina sérica bovina 0,5% em PBS, por 15 minutos. Após remoção do volume excedente do bloqueio, as lâminas foram incubadas com o anticorpo anti-IDO ABCAM (ab106134), diluído 1:10 na mesma solução de bloqueio (Leite + BSA), durante a noite e em câmara úmida à 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram incubadas com reagentes EnVision Flex HRP (K0690; Dako Co, Dinamarca), sendo o polímero anti-IGG e, na sequência, o substrato-cromógeno DAB para completar a reação (K346811; Dako Co, Dinamarca). Como etapa final, as

lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris e seladas com uma lamínula por meio de uso de solução de glicergel.

4.1.4 Análise imunohistoquímica

Para a quantificação, contamos com a colaboração da Dra. Kátia Ramos Moreira Leite, patologista e pesquisadora pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). A marcação tumoral muito fraca foi classificada como 0 (sem positividade), uma marcação forte e menor do que 50% da área tumoral foi considerada como escore 1 e uma marcação forte acima de 50% da massa tumoral foi considerada como escore 2. Foi realizada a soma dos três escores de cada paciente, por exemplo, o paciente que teve 2, 1 e 2 nas respectivas amostras ficou com um escore final de 5. A partir de então, para cada marcador e variável foi encontrada uma nota de corte via curva ROC, para então reclassificarmos em dois grupos: baixa expressão de IDO e alta expressão de IDO, possibilitando, assim, uma análise de correlação entre variáveis nominais.

4.2 Fase 2: Efeito do BCG sobre a expressão de IDO1 no CB

4.2.1 Análise *in vitro*

Como o objetivo desta fase foi avaliar um possível efeito do BCG sobre a expressão de IDO em linhagens de CB e não sobre a mortalidade das células, foram realizados experimentos para a determinação da concentração ideal de

BCG, a qual foi estimada em 1:1 (uma unidade formadora de colônia para cada célula de CB). A metodologia e resultados destes experimentos prévios são apresentados como Anexo 1.

4.2.1a Expressão de IDO em células humanas de CB incubadas com BCG

Para esta fase, 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 grau 1 e grau 3, respectivamente. Foram cultivadas e mantidas em cultura com meio RPMI 1640 (Vitrocell, Campinas, SP), suplementado com soro fetal bovino 10% (SFB) e antibióticos (50 U/ml penicilina e 0,05 mg/ml estreptomicina, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), a 37°C com 5% de CO₂.

Para a incubação com BCG, 2,0x10⁵ células RT4 ou T24 foram incubadas em placas de 6 poços (Corning, Nova Iorque, EUA), por 24 horas. No dia seguinte, o meio foi trocado por RPMI 10 % SFB, porém livre de antibióticos, e contendo 10 UFC de BCG por célula. O BCG foi adquirido comercialmente (Cepa Moreau, fabricado pela Fundação Ataulpho de Paiva, Rio de Janeiro, Brasil), sendo ressuspendido diretamente em meio de cultura RPMI, na concentração de 2X10⁶UFC/mL. As células de BC permaneceram 24 h incubadas com BCG, sendo depois incubadas em meio novo 10% SFB e antibióticos, sem conter BCG, por mais 24 h ou 96 h. Desta maneira, os períodos de incubação foram 48 h e 120 h a partir do contato com as micobactérias. Ao término do protocolo, as células foram tripsinizadas (incubação com solução de tripsina 0,25 % em tampão EDTA por 5 minutos a

37° C) e os *pellets* congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80° C para posterior extração de RNA. A Figura 6 apresenta o desenho esquemático dos experimentos.

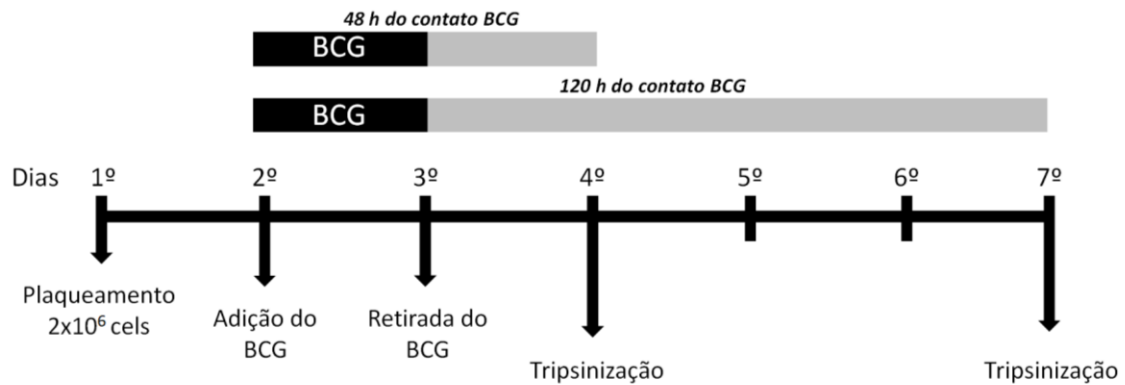


Figura 6. Desenho esquemático dos experimentos realizados com células RT4 e T24 incubadas com BCG por 24 h e mantidas em dois diferentes períodos 48 h e 120 h a partir da exposição com BCG.

4.2.1b Expressão deIDO em células humanas de CB incubadas com BCG e com células mononucleares

A fim de verificar a dependência de células do sistema imune na provável indução deIDO com BCG, foi realizado um ensaio associando a linhagem T24 com células mononucleares de sangue periférico humano. Este experimento foi realizado apenas com células T24.

Para tal, células T24 foram mantidas em protocolo de rotina de cultura padrão. Sangue total foi coletado de indivíduo saudável e as células mononucleares foram separadas em gradiente de densidade Ficoll-Paque, seguindo-se o protocolo do fabricante. As células T24 foram então incubadas

com BCG por 24 h, conforme protocolo descrito anteriormente, e depois cocultivada com células mononucleares por mais 96 h.

Resumidamente, as condições foram:

- **T24**: células T24 em protocolo padrão de cultivo;
- **T24+BCG**: células T24 incubadas com BCG;
- **T24/mono**: células T24 incubadas com BCG e depois cocultivadas com células mononucleares humanas;
- **T24/mono+BCG**: células T24 incubadas com BCG e depois cocultivadas com células mononucleares humanas.

Passado o período proposto, o sobrenadante foi removido, as células lavadas em PBS e tripsinizadas para armazenamento e posterior extração de RNA. A Figura 7 apresenta o desenho esquemático dos experimentos.

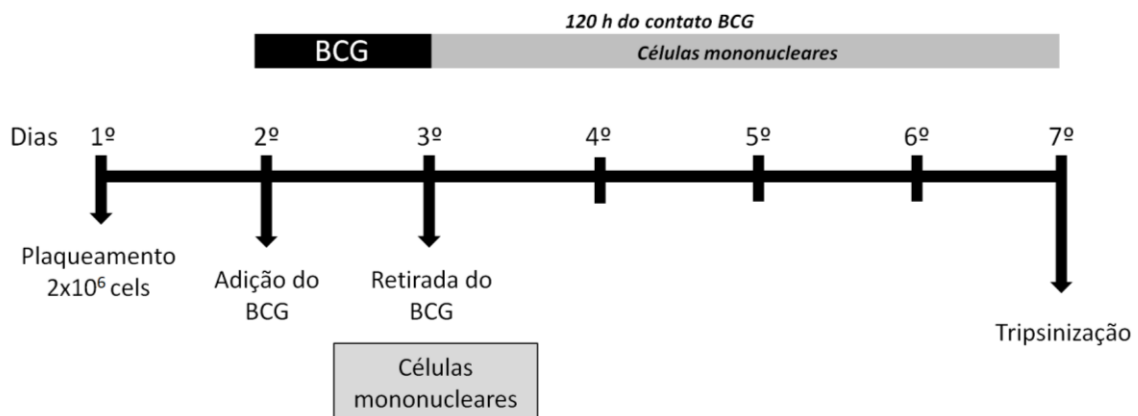


Figura 7. Desenho esquemático dos experimentos realizados com células T24 incubadas com BCG por 24 h e depois mantidas em cocultura com células mononucleares.

4.2.2 Análise *in vivo*

4.2.2a Modelo animal de CB

O modelo animal para CB escolhido foi o de inoculação de células MB49 (originada em camundongo isogênico C57Bl/6) em camundongos C57Bl/6 através da via transuretral. Todos os procedimentos foram realizados a partir da aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Nove de Julho (Protocolo-AN0025/2015).

Células MB49 (ATCC), já integrantes da rotina de cultura em nosso laboratório, foram mantidas em cultura com meio RPMI 1640, suplementado com SFB 10%, antibióticos (50 U/ml de penicilina e 0,05 mg/ml de estreptomicina) e L-glutamina (2mM), sob atmosfera a 5% de CO₂ e temperatura de 37°C.

Após atingirem confluência de aproximadamente 80%, foram tripsinizadas (incubação com solução de tripsina 0,25 % em tampão EDTA por 5 minutos a 37° C) e ressuspensas em tampão PBS na concentração de 2,0x10² células por microlitro. A viabilidade foi determinada através da coloração por azul de tripan, contendo um mínimo de 90% de células viáveis.

Camundongos C57Bl/6 fêmeas foram devidamente anestesiados com solução de quetamina e xilazina para uma dose de 100mg/Kg e 10mg/Kg, respectivamente. Após confirmação da anestesia, foi utilizado um cateter estéril de polietileno 24 G sem agulha, que após ser lubrificado com gel hidrossolúvel, foi delicadamente introduzido através da uretra e acoplado diretamente a uma seringa de insulina. Após remoção do volume urinário com o uso da seringa, foi realizada a instilação com PBS na região interna da bexiga, para lavagem da

região. Após a remoção do PBS, 100 µl de solução de nitrato de prata (AgNO₃) 1M foi administrada, permanecendo na bexiga por 10 segundos a fim de causar uma leve lesão na camada urotelial, permitindo a instalação das células tumorais. Após remoção da solução, a bexiga é lavada novamente com PBS, por 5 vezes, garantindo a remoção dos resíduos de nitrato de prata.

Um volume de 50 µl da suspensão de células MB49 em PBS foi inoculado, contabilizando um total de 1,0X10⁴ células por animal, e mantidas com o animal imóvel por um período de 45 minutos. Este número de células foi baseado em estudo previamente publicado⁸⁸e também padronizado em nosso laboratório.

4.2.2b Grupos experimentais, acompanhamento e eutanásia

O período de acompanhamento dos animais foi definido com base no estudo de Dobek e colaboradores⁸⁸.A confirmação do estabelecimento do tumor foi realizada pela presença de hematúria macro ou microscópica, em um período de até 7 dias após o procedimento de inoculação. Os animais, então, foram divididos em 2 grupos:

- Controle(n=8): animais que receberam apenas veículo (PBS) durante um período de 4 semanas, após confirmada a instalação do CB;
- BCG (n=8): animais que receberam BCG durante um período de 4 semanas, uma vez por semana, após confirmada a instalação do CB;

O peso dos animais foi verificado a cada 3 dias, bem como a presença de hematúria, que caracterizou a instalação com sucesso do tumor de maneira

indireta. Concomitante à verificação da hematúria, a ultrassonografia foi utilizada para confirmar a presença de massa tumoral pouco antes da primeira instilação com BCG. O volume tumoral foi avaliado a cada três dias, com o auxílio de um paquímetro.

As Figuras 8 e 9 resumam o procedimento realizado e tempos de acompanhamento e tratamento dos animais, assim como o detalhamento da confirmação do tumor por meio de hematúria e ultrassonografia (Figura 9).

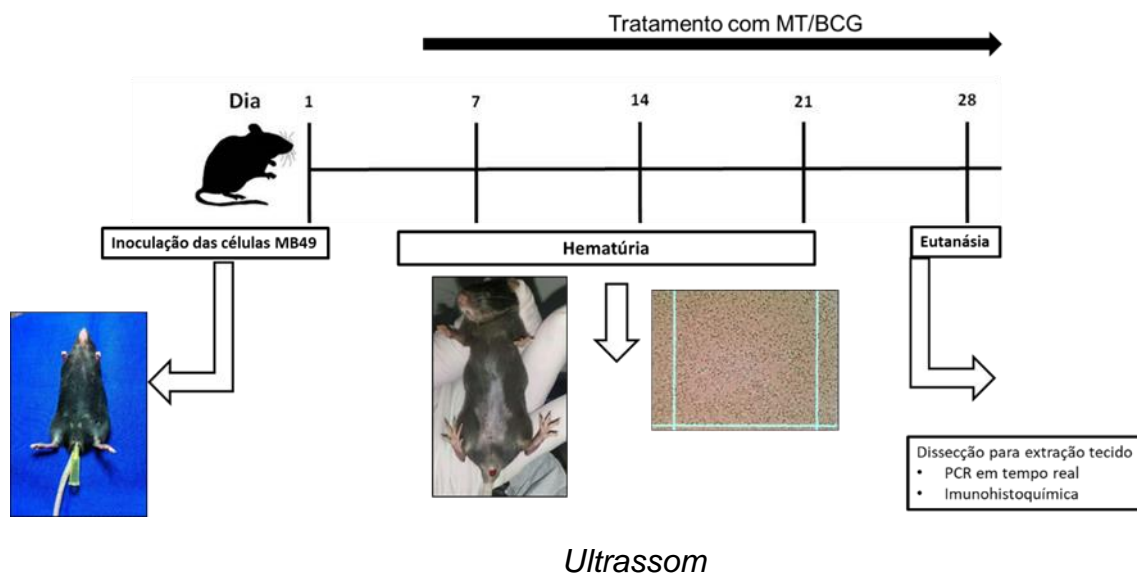


Figura 8. Desenho esquemático do protocolo animal. A partir do quinto dia (aproximadamente) foi possível observar hematúria. Os tratamentos com MT e BCG são realizados a partir do quinto dia de protocolo, após confirmação do estabelecimento do tumor. Por fim, o procedimento de eutanásia é realizado e o tecido tumoral encaminhado para as análises propostas.

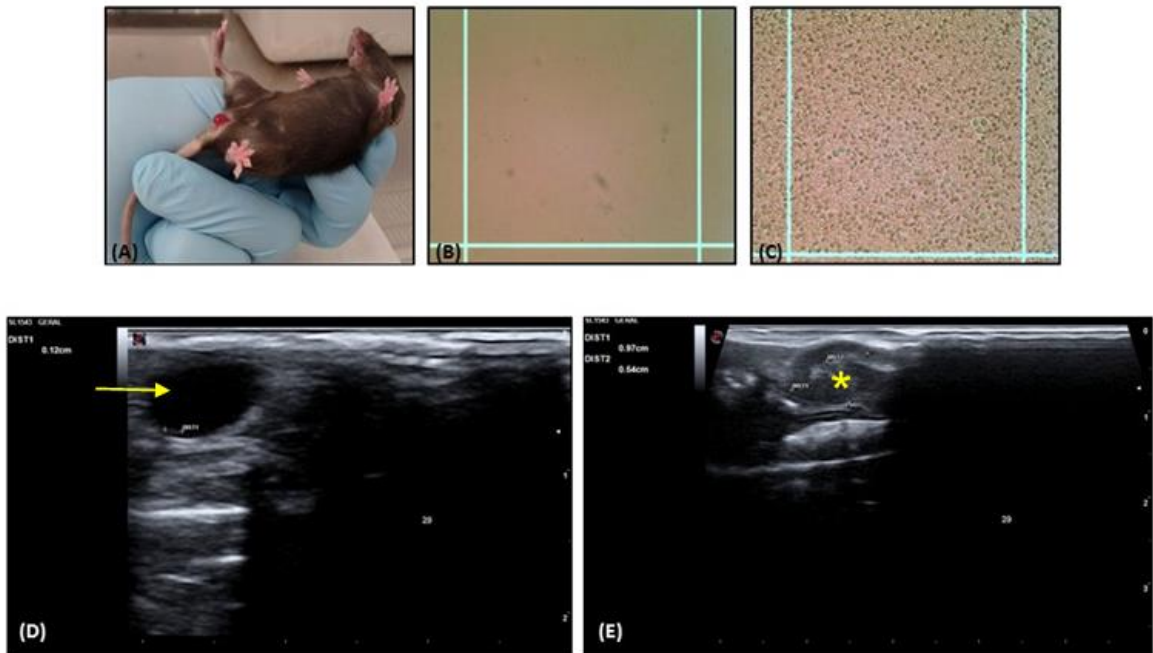


Figura 9. Modelo murino ortotópico de CB. Os animais receberam células MB49 pela via transuretral. Após aproximadamente 5 dias da instilação, os animais apresentam hematúria macroscópica (A). Enquanto animais não-inoculados não apresentam hematúria (B), animais que receberam células MB49 apresentam hematúria microscópica (C). Enquanto animais normais apresentam a luz vesical livre à ultrassonografia (seta em D), animais que receberam células MB49 apresentam tumor após 3 semanas da instilação (asterisco em E).

O tratamento com BCG foi iniciado aproximadamente 5 dias após a inoculação das células MB49, sendo mantido semanalmente ao longo do período de acompanhamento. Para tanto, foi instilado um volume de 100 μ l de PBS contendo $1,5 \times 10^6$ UFC de BCG, permanecendo na bexiga por 30 minutos. A concentração de BCG foi estabelecida baseando-se em estudos prévios^{80,89}. Durante este procedimento, os animais permaneceram anestesiados com quetamina(100mg/Kg) e xilazina(10mg/Kg).

Durante todo o período de protocolo dos animais, foram verificadas as condições que estabelecem o bem-estar e condições passíveis de interrupção precoce do protocolo. Para tal, foram estabelecidos critérios de “*endpoint*”

(momento em que se deve intervir para evitar o sofrimento animal, nem que esta intervenção seja a eutanásia, conforme definição original publicada pelo *Canadian Council on Animal Care*(CCAC) em 1998: *“Endpoint is defined as the point at which an experimental animal's pain and/or distress is terminated, minimized or reduced, by taking actions such as killing the animal humanely, terminating a painful procedure, or giving treatment to relieve pain and/or distress”* ⁹⁰. O *endpoint* adotado foi a perda de peso acima ou igual a 10% do peso no início do protocolo e/ou prostração com pelo eriçado.

O procedimento de eutanásia foi realizado com quetamina e xilazina, pela via intraperitoneal, nas doses de 300 mg/Kg e 30 mg/Kg, respectivamente, doses que equivalem a três vezes a dose anestésica convencional. A eutanásia foi concluída por deslocamento cervical, após extração do tecido vesical.

A bexiga contendo o tumor foi coletada e dividida em duas seções com auxílio de um bisturi, encaminhando uma porção diretamente para congelamento em nitrogênio líquido e armazenada em freezer -80°C (para análise em biologia molecular) e outra parte destinada à histologia. Para histologia, o tecido foi mantido em formol tamponado 10% por 24 h, sendo depois mantido em álcool etílico 70% até emblocamento em parafina.

4.2.2c Análise imunohistoquímica em CB

A expressão de IDO no tecido tumoral foi analisada por meio de imunohistoquímica, para verificação da expressão proteica, bem como visualização das regiões de maior expressão, e de PCR em tempo real. Além disso, foi também avaliado o número de linfócitos T no tecido tumoral por meio de imunohistoquímica para CD3.

Os procedimentos de imunohistoquímica realizados seguiram os mesmos princípios e kits comerciais utilizados no procedimento realizado com a análise de IDO em biópsias humanas descrito anteriormente. Na análise de linfócitos, o anticorpo primário usado foi o anti-CD3 (Anti-CD3 clone SP7 - ABCam, Cambridge, Reino Unido), na diluição 1:100, também seguindo os mesmos princípios da técnica já descritos anteriormente.

As análises foram realizadas através da contagem de células positivas para IDO ou CD3 em campos contendo regiões de tumor sem a presença de infiltrados inflamatórios. A contagem foi realizada de maneira “cega”, sob microscopia ótica (aumento de 200x).

4.3 Fase 3: Efeito dos inibidores da IDO sobre o CB

4.3.1 Análise *in vitro*

Para a inibição da IDO, utilizamos os seguintes inibidores químicos adquiridos comercialmente: 1-metil-D-triptofano (MT; cat 452483, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e INCB024360-analog-5L (INCB; Incyte, Monmouth Junction, NJ).

Células RT4 e T24 foram cultivadas de rotina conforme descrito anteriormente. Para a realização dos tratamentos propostos, as células foram mantidas inicialmente em garrafas de 75cm² até atingirem cerca de 80% de confluência. Após tripsinização, foram semeadas em placas de 6 poços, com 100.000 células por poço em meio RPMI 1640 10% SFB e 1% de antibióticos, e mantidas por 24 h para aderência das células aos poços. Após as 24h, as células foram colocadas em processo de *starvation* para normalização do ciclo celular, ou seja, foram mantidas em RPMI 1640 com apenas 1% SFB.

Foram estabelecidos 3 grupos experimentais para cada tipo celular:

- **Controle:** células contendo apenas meio de cultura e veículo (DMSO);
- **MT:** células que receberam MT na concentração de 500 µM, diluído previamente em DMSO;
- **INCB:** células contendo o análogo INCB024360, em concentração de 1 µM, diluído previamente em DMSO.

As concentrações de ambas substâncias utilizadas foram obtidas com base em estudos anteriores⁹¹ e mantidas em estufa por 48h à 37°C, 5%CO₂.

Sob tais parâmetros, foi investigada por PCR em tempo real a expressão de IDO, AHR, CYP1A1 e CHOP.

4.3.2 Análise *in vivo*

Apenas o MT foi testado em modelo animal, pois não foi possível adquirirmos o INCB de maneira suficiente.

Nesta fase, utilizamos o mesmo modelo animal descrito anteriormente, o modelo de inoculação ortotópica de células MB49 em camundongos C57BL6. Assim, dois grupos foram comparados nessa fase:

- **Controle**(n=8): animais que receberão apenas veículo durante um período de 4 semanas, após confirmação da instalação tumoral;
- **MT** (n=8): animais que receberão MT diariamente durante um período de 4 semanas, após confirmação da instalação tumoral.

Para o tratamento com MT, os animais receberam MT através de gavagem, uma vez ao dia, na dose de 100 mg/Kg, conforme estudo farmacológico previamente realizado⁹². O MT (1-Metil-D-triptofano, cat. 452483, Sigma-Aldrich) foi dissolvido em óleo de soja pouco antes da administração. Animais não tratados receberam apenas veículo.

Todas as análises, procedimento de eutanásia e extração de tecido tumoral foram realizadas conforme descrito anteriormente.

4.3.3 Análise da atividade da IDO

A atividade da IDO foi verificada para avaliar a eficácia dos inibidores. Para tanto, foi dosada a L-quinurenina no sobrenadante das células por meio de cromatografia líquida de alta precisão (HPLC).

Para esta análise, o sobrenadante das células RT4 e T24 tratadas ou não com os inibidores MT e INCB foi armazenado em freezer -80° C. No dia da análise, o sobrenadante foi descongelado em gelo, seguindo-se a desproteinização com adição de ácido tricloroacético 10% na proporção 1:1 e centrifugação a 5.000g, por 15 minutos, a 4°C. Em seguida, o sobrenadante desproteinizado foi recolhido e filtrado com seringa acoplada a filtro de 0,22µm, a fim de remover resíduos celulares e macropartículas.

As amostras foram então analisadas em aparelho HPLC (Agilent 1220 infinity, California, USA), com coluna 18C, e protocolos estabelecidos de 10 minutos de tempo de corrida por amostra, a 0,5 mL de fluxo por minuto, sob comprimento de onda de captação de 254nm, correspondente ao espectro de excitação da L-quinurenina. Padrões com três concentrações de L-quinurenina (50, 10 e 1 µM) foram usados para construção de curva padrão.

4.4 Biologia molecular

4.4.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a extração de RNA total de tecido tumoral, as amostras foram retiradas do freezer -80° C e maceradas em almofariz contendo nitrogênio

líquido. Após maceração, o volume de 1 mL de reagente TRIzol (Invitrogen, Califórnia, EUA) para cada 100 mg de tecido foi adicionado, homogeneizando-se a amostra. Na sequência, o material foi transferido para microtubo livre de RNAses e centrifugado a 12.000G, a 4° C, por 15 minutos.

Para a extração de RNA total de células cultivadas, foi utilizado o kit PARIS™ (ProteinAnd RNA Isolation System), AppliedBiosystems, CA, USA).

A determinação da concentração de RNA foi feita por meio do espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher, Califórnia, EUA). O mesmo equipamento foi usado para avaliar as relações 260/280 e 230/280 nm e, conseqüentemente, a pureza das amostras.

Para a etapa de transcriptase reversa, foi utilizada a enzima SuperScript III (Invitrogen, Califórnia, EUA), segundo instruções do fabricante.

4.4.2 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, foram realizados, além de uma curva de melting, utilizando-se o equipamento 7500™ Real-Time PCR System (AppliedBiosystems, Califórnia EUA). Os primers utilizados no estudo foram:

Tabela 1. Primers utilizados para PCR em tempo real.

Gene	Primers		Identificação nm	Amplicon
	Sense 5'-3'	Antisense 5'-3'		
TBP (housekeeping humano)	TTCGGAGAGTTCTGGGATTGTA	TGGACTGTTCTTCACTCTTGGC	NM_003194.5	227
IDO(humano)	GGTCATGGAGATGTCCGTAA	ACCAATAGAGAGACCAGGAAGAA	NM_002164.5	181
CHOP	TTCACCACTCTTGACCCTGCTTC	TTCCTGGTTCTCCCTTGGTCTTC	NM_001195053.1	158
AHR	ACATCACCTACGCCAGTCGTCGC	TCTATGCCGCTTGAAGGAT	NM_001621.5	101
CYP1A1	CTATCTGGGCTGTGGGCAA	CTGGCTCAAGCACAACCTGG	NM_000499.5	138
β -actina(housekeeping camundongo)	AGGAGTACGATGAGTCCGGCCC	GCAGCTCAGTAACAGTCCGCCT	NM_031144.2	70
IDO(camundongo)	TATTGCTGTTCCCTACTG	GGTCTTGACGCTCTACT	NM_008324.2	260

4.5 Análise estatística

Os resultados são representados pela média \pm desvio padrão ou como mediana e valores mínimos e máximos. A curva ROC e índice de Yuden foram usados para o estabelecimento de pontos de corte no estudo com humanos. A análise de correlação das variáveis nominais foi realizada através do teste Qui-quadrado. Na análise de sobrevivência, curva de Kaplan Meier foi adotada. Teste T ou teste ANOVA One-Way com correção de Bonferroni foram usados nos estudos de cultura de células e com animais. A significância estatística foi considerada a partir do $p < 0,05$.

5 Resultados

5.1 Fase 1: Correlação entre IDO e parâmetros clinicopatológicos

5.1.1 Características da população selecionada

Com relação aos 88 casos de CB NMI, foram classificados e selecionados com base nos dados clinicopatológicos, tendo como principal fator de classificação o grau histológico e o estágio do tumor (Tabela 2). A recidiva foi considerada após seguimento de 3 anos da primeira indução com BCG.

Para os 67 casos de CB MI, os critérios de classificação e inclusão no estudo tiveram a mesma base adotada para os CB NMI. A Tabela 3 apresenta as características clinicopatológicas dos pacientes com CB MI.

Tabela 2. Características clinicopatológicas dos pacientes com CB NMI.

Casos	
Idade (40-92a)	
> 60	20 (22,7 %)
≤ 60	68 (77,3 %)
Gênero	
Feminino	20 (22,7 %)
Masculino	68 (77,3 %)
Tabagismo	
Fumante	65 (73,9 %)
Não Fumante	23 (26,1 %)
Grau Histológico	
G1	41 (46,6 %)
G3	47 (53,4 %)
Estadio	
Ta	68 (77,3 %)
T1	20 (22,7 %)
Grupo de Risco	
Alto Risco	50 (56,8 %)
Risco Intermediário	33 (37,5 %)
Baixo Risco	5 (5,7 %)
Progressão	
Sim	15 (17,0 %)
Não	73 (83,0 %)
Recidiva	
Sim	51 (58,0 %)
Não	37 (42,0 %)

Tabela 3. Características clinicopatológicas dos pacientes com CB MI.

Casos	
Idade (32-86a)	
> 60	10 (14,9%)
≤ 60	57 (85,1%)
Gênero	
Feminino	14 (20,9%)
Masculino	53 (79,1%)
Tabagismo	
Fumante	19 (28,4%)
Ex-fumante	32 (47,8%)
Não Fumante	7 (10,4%)
Não declarado	9 (13,4%)
Grau Histológico (RTU)	
G1	1 (1,5%)
G3	66 (98,5%)
Estadio	
T2	22 (32,8%)
T3	26 (38,8%)
T4	19 (28,3%)
Recidiva	
Sim	29 (43,3%)
Não	38 (56,7%)

5.1.2 Análise da expressão de IDO em espécimes humanas de CB

A imunohistoquímica para IDO foi realizada com sucesso. Conforme demonstrado na Figura 10, houve marcação para IDO nas amostras do TMA. Embora haja marcação em células de infiltrado inflamatório, foi considerada apenas a marcação em células tumorais.

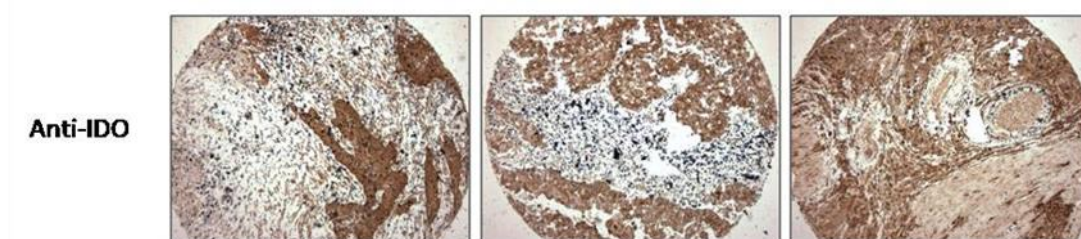


Figura 10. Imunohistoquímica para IDO em espécimes de CB NMI. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina e a positividade é observada em marrom. Da esquerda para a direita, representação de escore 1, 2 e 2, respectivamente.

5.1.3 Correlação entre a expressão de IDO e os parâmetros patológicos

A Tabela 4 apresenta a comparação entre o perfil de expressão de IDO contra grau, estadió, progressão, recidiva e tumorais em tumores NMI. Foi possível observar correlação positiva de IDO com o grau e o estadió ($p < 0,05$). Não foi observada correlação de IDO com progressão e recidiva nos casos estudados.

Tabela 4. Análise de correlação entre a expressão de IDO e os dados patológicos.

	Baixa expressão IDO1	Alta expressão IDO1	Total	Valor de p
Grau 1	14 (34 %)	27 (65 %)	41	<i>P<0,05*</i>
Grau 3	5 (11 %)	42 (89 %)	47	
Estadio T0	18 (26 %)	50 (74 %)	68	<i>P=0,041*</i>
Estadio T1	1 (5 %)	19 (95 %)	20	
Com progressão	13 (18 %)	60 (82 %)	73	<i>P=0,843</i>
Sem progressão	3 (20 %)	12 (80 %)	15	
Sem recidiva	16 (43 %)	21 (57 %)	37	<i>P=0,258</i>
Com recidiva	16 (31 %)	35 (69 %)	51	

Por fim, também foi realizada a comparação dos casos de tumores NMI e MI (Tabela 5), o último grupo sendo correspondente aos pacientes submetidos à cistectomia e que apresentaram tumores em estadiamento T2 ou superior. Conforme pode-se observar, há maior frequência de casos com alta expressão de IDO quando se trata de CB MI ($p<0,05$).

Tabela 5. Análise de qui-quadrado comparando a frequência de baixa e alta expressão de IDO nos casos de CB NMI e MI.

	Baixa expressão IDO1	Alta expressão IDO1	Total	Valor de p
NMI	69 (78 %)	19 (22 %)	88	<i>P<0,05*</i>
MI	42 (63 %)	25 (37 %)	67	
Total de casos	110 (71 %)	43 (29 %)	155	

5.1.4 IDO vs. Sobrevida livre da doença

Foi comparada a expressão de IDO e a sobrevida livre de doença entre a realização da RTU e a recidiva. Não foi encontrada diferença na sobrevida livre de doença entre os indivíduos que apresentam baixa ou alta expressão de IDO (Figura11).

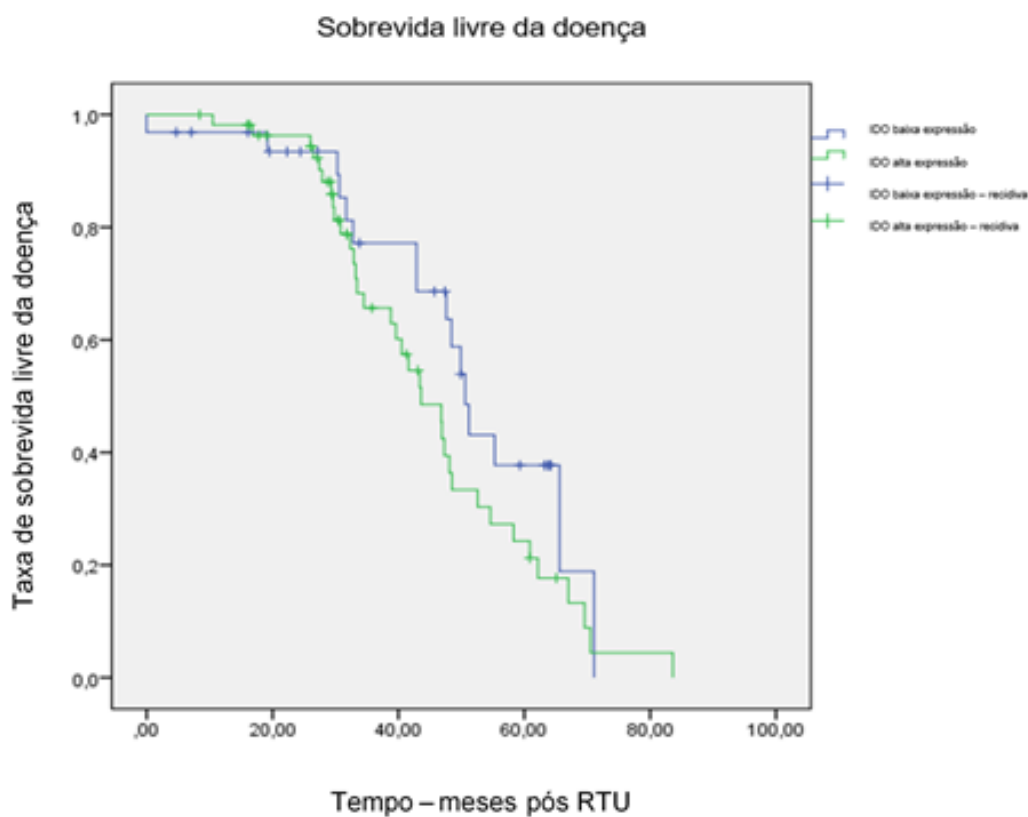


Figura 11. Sobrevida livre de doença (meses) dos pacientes com baixa e alta expressão de IDO.

5.2 Fase 2: Efeito do BCG sobre a expressão de IDO1 no CB

5.2.1 Modelo *in vitro* para avaliação dos efeitos do BCG sobre a expressão de IDO1

5.2.1a Expressão de IDO em células humanas de CB incubadas com BCG

Após incubação de células RT4 e células T24 com BCG (proporção de 1/1) durante 48h, a expressão de IDO foi analisada por meio de PCR em tempo real. Conforme podemos observar na Figura 12, a incubação com BCG não modificou a expressão de IDO em células RT4 e T24.

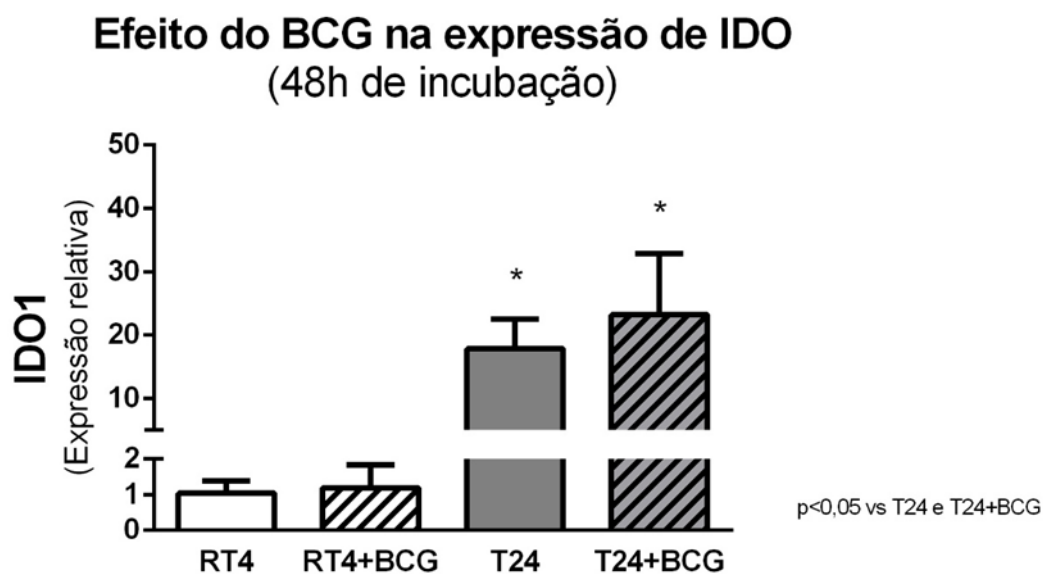


Figura 12. Comparação entre as expressões de IDO em células RT4 e T24 após 48h de incubação com BCG.

Semelhante ao encontrado com 48 h, a incubação com BCG por 120 h também não alterou a expressão de IDO tanto em células RT4 como em T24 (Figura 13).

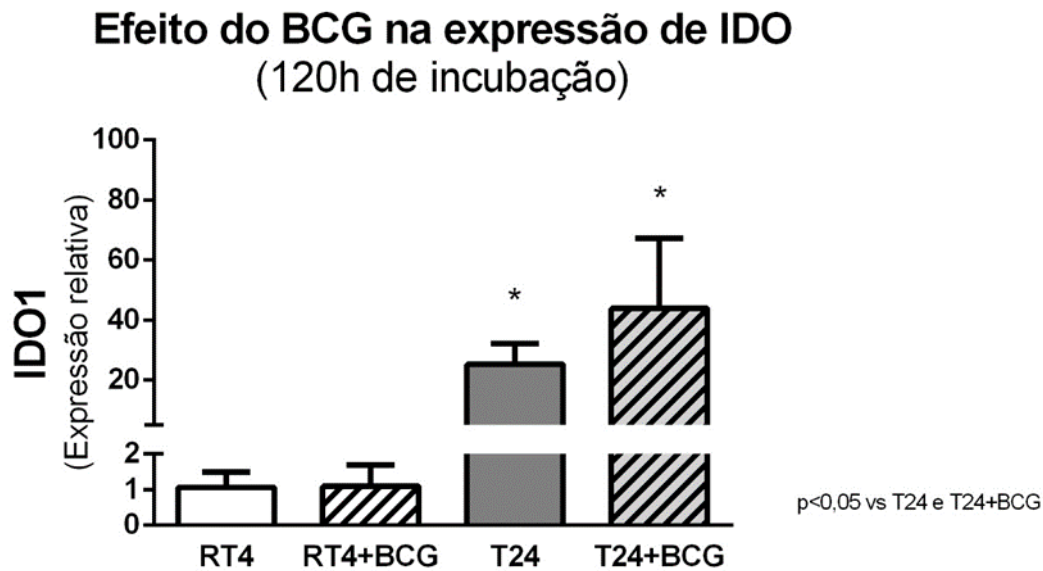


Figura 13. Comparação entre as expressões de IDO em células RT4 e T24 após 120h de incubação com BCG.

5.2.1b Expressão de IDO em células humanas de CB incubadas com BCG e células mononucleares

Conforme demonstrado na Figura 14, a expressão de IDO é maior em cocultura quando comparada com cultura simples de T24. Contudo, o contato com BCG não alterou a expressão de IDO.

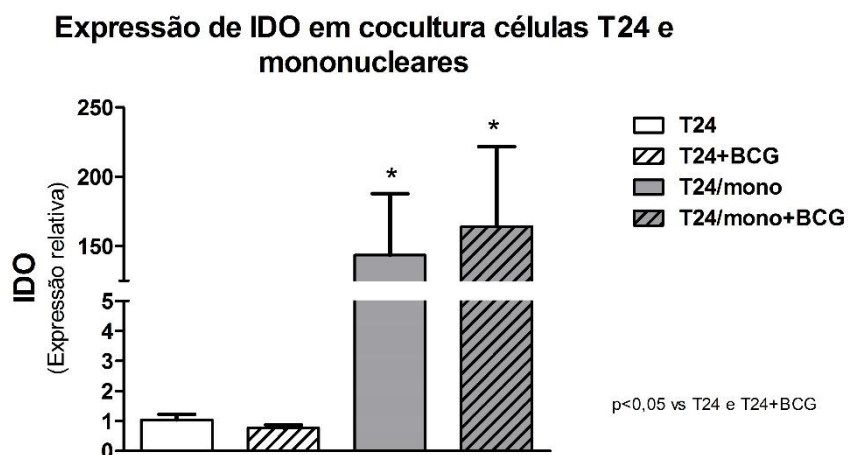


Figura 14. Expressão de IDO em células T24 cocultivadas ou não com células mononucleares de sangue periférico humano (mono). A presença de BCG não alterou a expressão de IDO após 5 dias de incubação.

5.2.2 Modelo *in vivo* para avaliação dos efeitos do BCG sobre a expressão de IDO1

5.2.2a Análise da expressão da IDO em CB murino exposto ao BCG

Foi possível estabelecer o modelo murino ortotópico de CB em nossa universidade. A análise histológica confirma o tumor desenvolvido após 4 semanas da inoculação das células MB49 (Figura 15). A massa tumoral cresce em direção da cavidade abdominal. Nota-se áreas de necrose e áreas com infiltrado inflamatório.

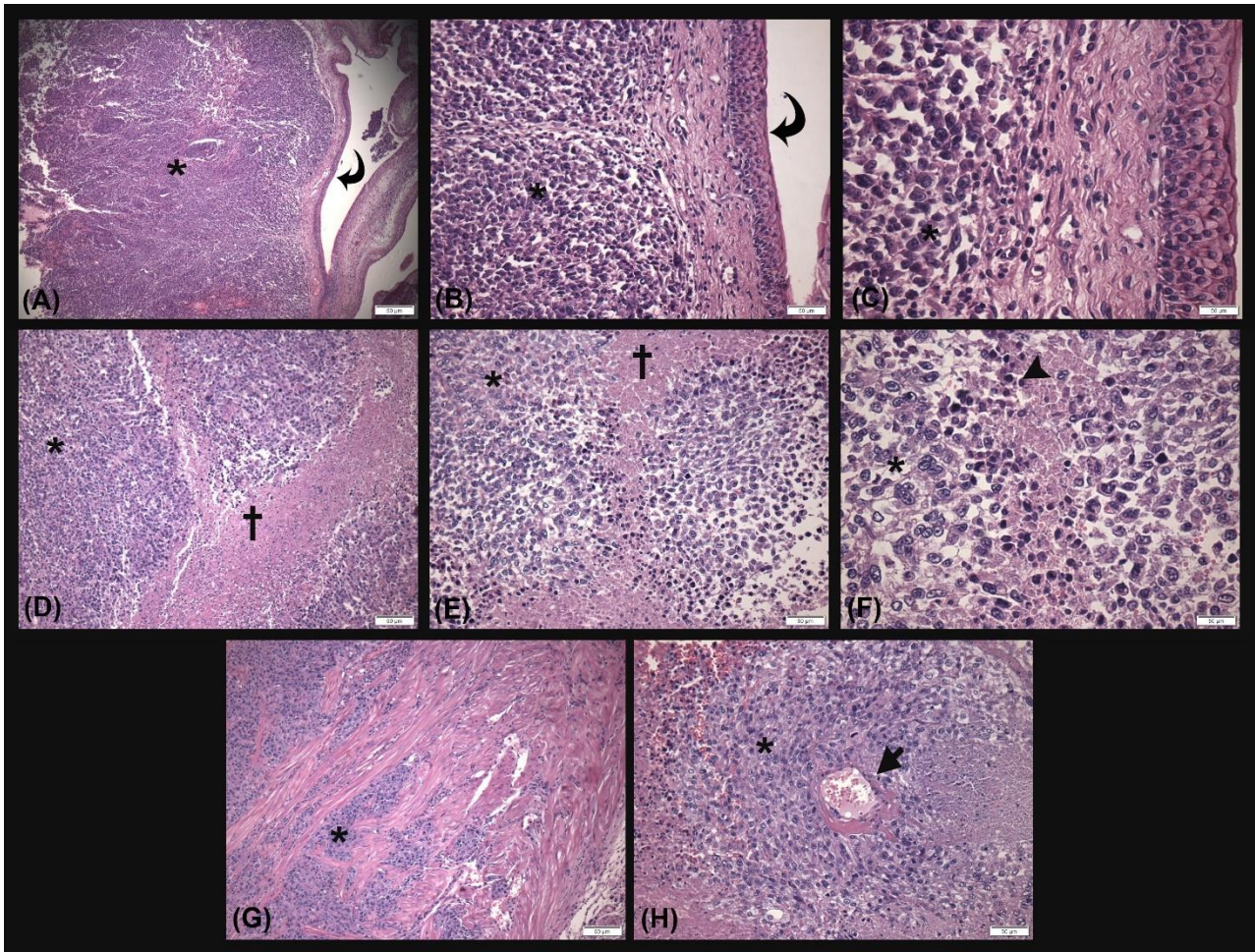


Figura 15. Tumor formado por células MB49 (asterisco em todas as imagens) com urotélio preservado (seta curva em A e B). Há presença de áreas com necrose (cruz, D e E) e células inflamatórias (cabeça de seta em F). As células MB49 infiltraram a musculatura vesical (G) e induziram a formação de vasos sanguíneos tumorais (seta, H). Magnificação de 40X (A, D e G), 200X (B, E e H) e 400X (C, F).

A Figura 16 ilustra a expressão de IDO1 em tumor de células MB49 desenvolvido após 4 semanas da inoculação das células, avaliada por imunohistoquímica. A positividade ocorre de maneira constitutiva, porém não é apresentada de maneira homogênea.

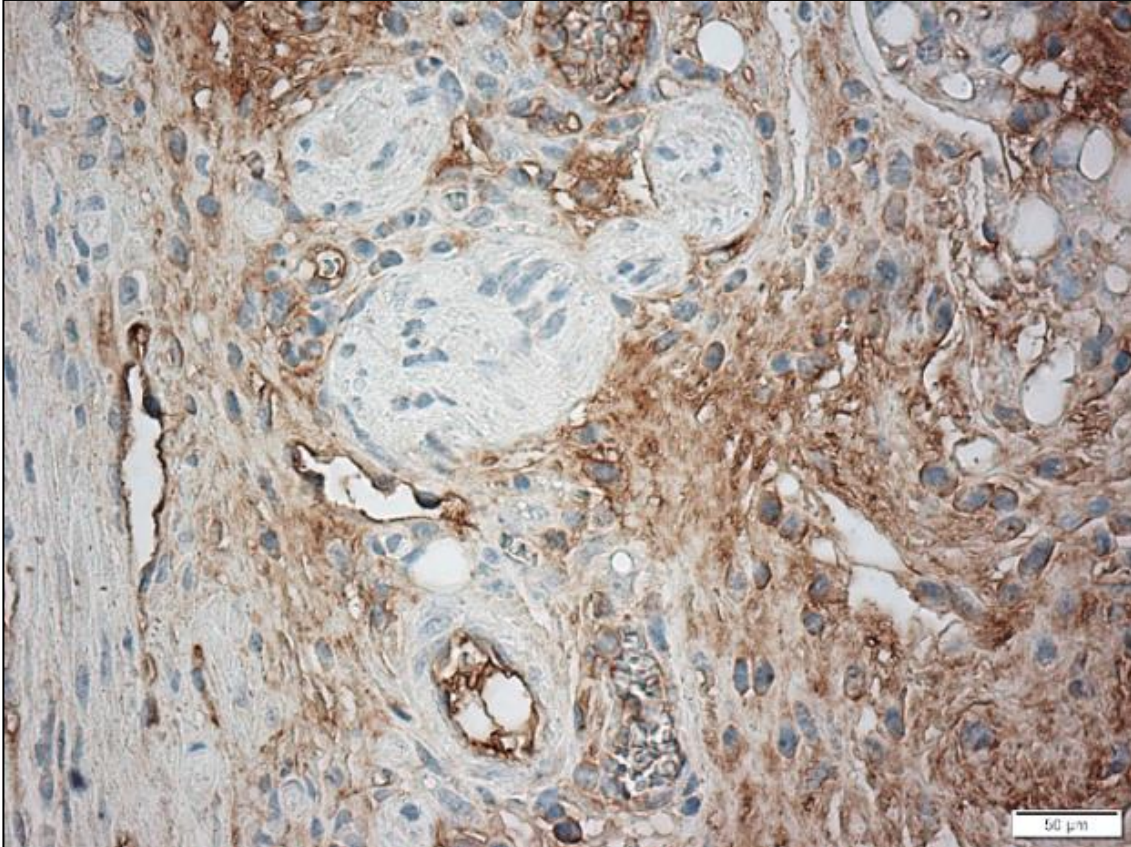


Figura 16. Imunohistoquímica para IDO em tumor formado por células MB49. A marcação aparece com coloração acastanhada. Magnificação de 200X.

Na análise semiquantitativa (imunohistoquímica), não foi observada diferença na expressão de IDO1 entre animais tratados ou não com BCG (Figura 17A). Corroborando os resultados imunohistoquímicos, a análise por PCR em tempo real mostrou que não há diferença na expressão de IDO1 entre animais tratados ou não com BCG (Figura 17B).

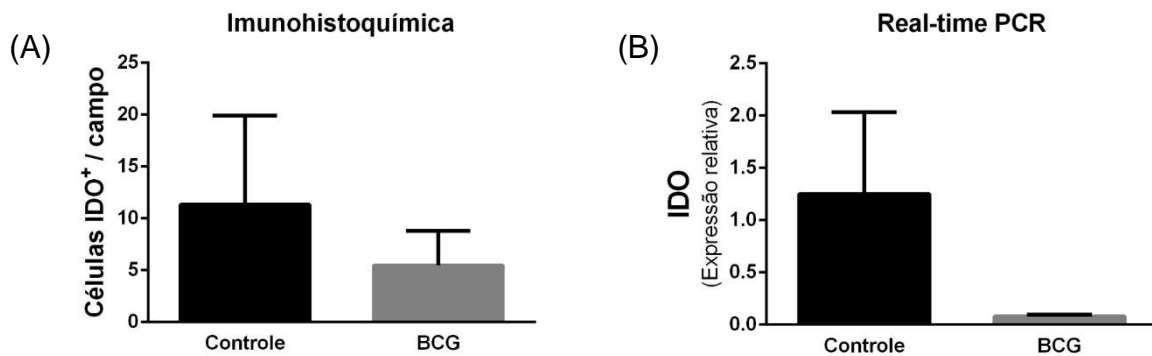


Figura 17. Análise da expressão de IDO1 em tumor murino ortotópico, avaliada por imunohistoquímica (A) e PCR em tempo real (B) (n=8 em ambas comparações).

5.2.2b Efeito do BCG sobre a sobrevivência dos animais

Também foi comparado o efeito do BCG sobre a sobrevivência (Figura 18) dos animais portadores de tumor de bexiga. Como é possível observar, o uso de BCG não influenciou a sobrevivência dos animais.

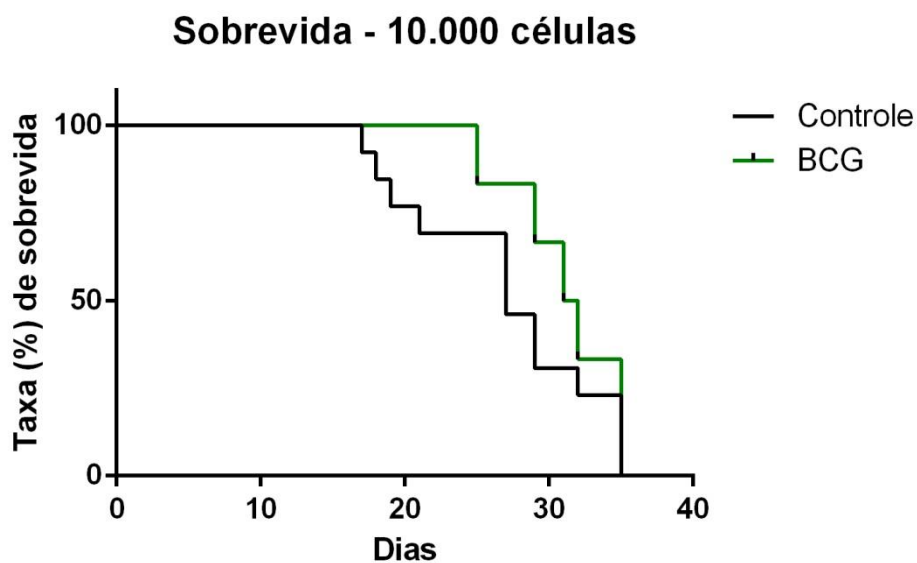


Figura 18. Sobrevivência dos animais representada em gráfico Kaplan Meier entre grupos Controle e BCG (n=8).

5.2.2c Efeito do BCG sobre o crescimento tumoral

Como é possível observar na Figura 19, o tratamento com BCG não influenciou o volume tumoral.

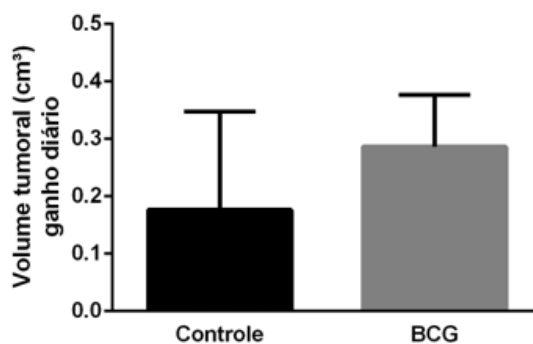


Figura 19. Volume tumoral no dia da eutanásia (n=8).

5.2.2d Efeito do BCG sobre o número de linfócitos T tumorais

Conforme demonstrado na Figura 20, o tratamento com BCG não influenciou o número de linfócitos T tumorais.

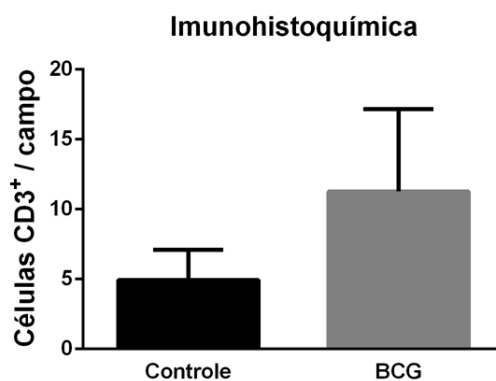


Figura 20. Número de linfócitos T CD3+ por campo (aumento de 400X). Para esta análise, foram analisados 50 campos de cada caso (n=8).

5.3 Fase 3: Efeito dos inibidores da IDO sobre o CB

5.3.1 Análise *in vitro*

5.3.1a Comparação da expressão da IDO1 e suas vias em diferentes linhagens de CB

Como é possível observar na figura 21A, a expressão de IDO1 é aproximadamente 70 vezes maior em células T24 (Expressão relativa de $1,0 \pm 0,1$ em RT4 e $73,8 \pm 17,0$ em T24, $p < 0,05$), assim como a expressão de CHOP e CYP1A1 apresentam-se também maiores em células T24 (Expressão relativa de $1,0 \pm 1,2$ em RT4 e $10,5 \pm 4,5$ em T24 para CHOP (Figura 21B), $p < 0,05$ e de $1,0$ em RT4 e $28,2 \pm 1,5$ em T24 para CYP1A1 $p < 0$ (Figura 21C), $p < 0,05$). Já em relação ao AHR não foi encontrada diferença entre as células (Figura 21D).

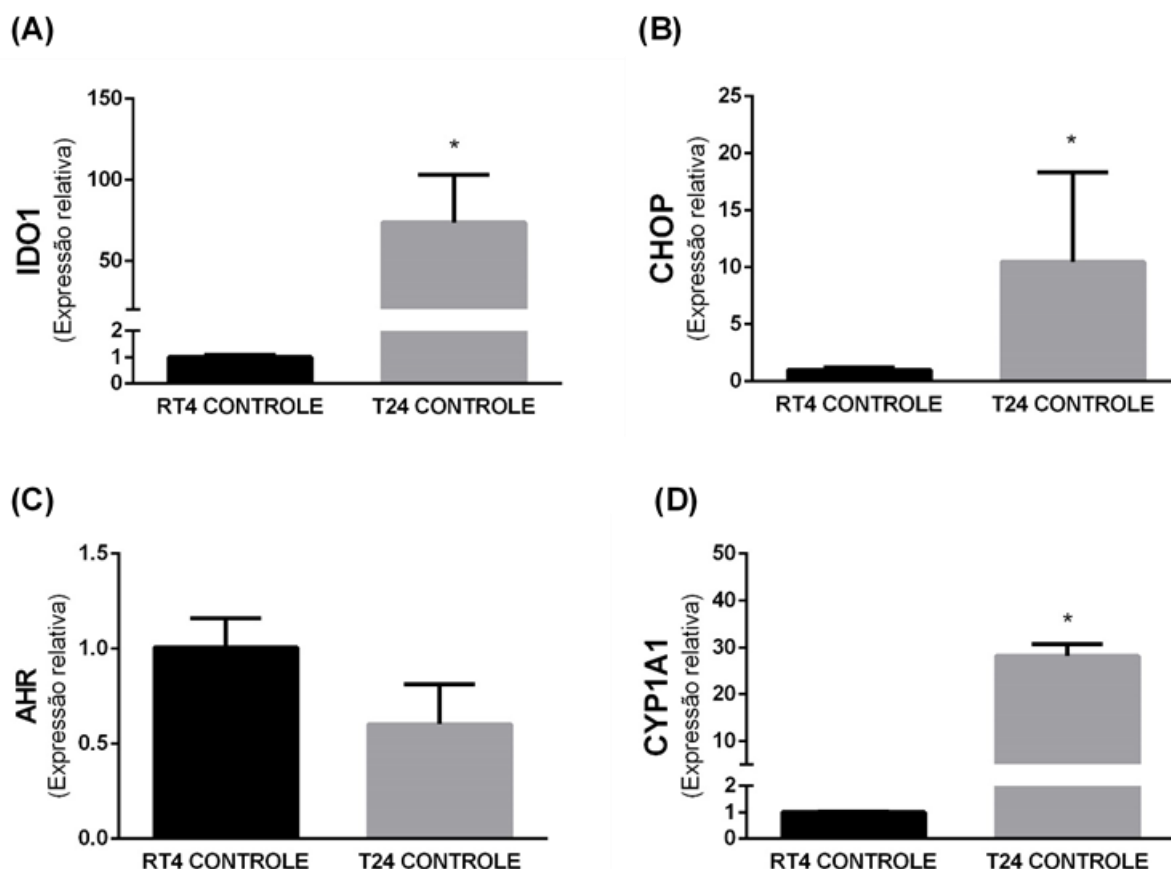


Figura 21. Comparação das expressões gênicas entre células RT4 e T24. Foi realizado PCR em tempo real para a comparação da expressão dos genes IDO (A), CHOP (B), AHR (C) e CYP1A1 (D) (* = $p < 0.05$).

5.3.1b Efeito dos inibidores da IDO sobre a atividade e expressão de IDO1

A análise da atividade da IDO foi realizada por meio da dosagem de quinurenina no sobrenadante das células. Com relação às células RT4, não foi possível detectar quinurenina no meio de cultura. Já com as células T24, foi possível detectar quinurenina no sobrenadante e a presença tanto do MT como do INCB024360 diminuiu significativamente a quantidade de quinurenina no meio de cultura (Figura 22).

Quinurenina (células T24)

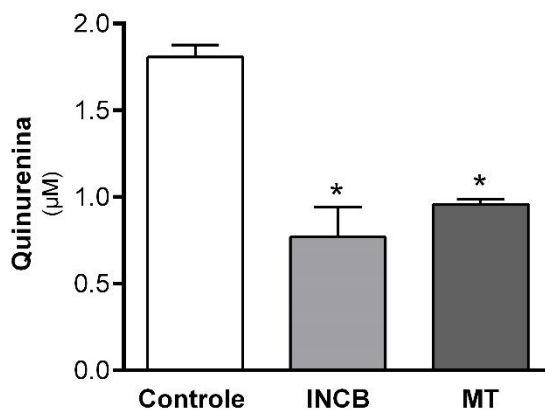


Figura 22. Dosagem de quinurenina em sobrenadante de células T24 incubadas com inibidores da IDO. INCB: INCB024360. * $p < 0,05$ vs. Controle.

Com relação à expressão de IDO1, os tratamentos com ambos inibidores foram eficientes para garantir a inibição da expressão de IDO em células T24 (Expressão relativa de $1,05 \pm 0,42$ em controle vs. $0,24 \pm 0,16$ em INCB e $0,35 \pm 0,16$ em MT; $p < 0,05$) (Figura 23B). Este efeito, todavia, não foi observado em células RT4 (Figura 23A).

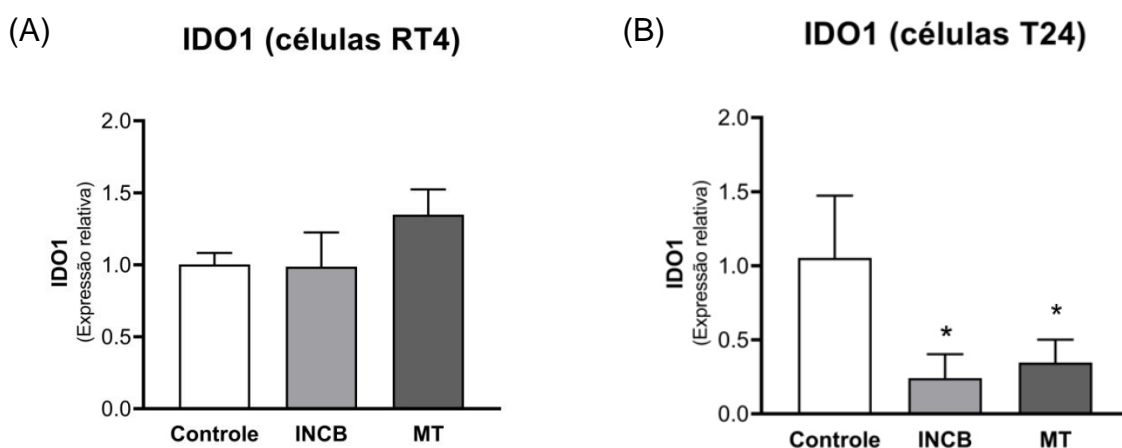


Figura 23. Expressão de IDO em células RT4 (A) e células T24 (B) incubadas com inibidores químicos da IDO.

5.3.1c Efeito dos inibidores daIDO sobre as vias de ativação daIDO1

Ao analisar os efeitos dos dois inibidores sobre as vias daIDO, não foi observada diferença na expressão deCHOP entre os grupos (Figura 24), com um aumento na expressão deAHR apenas em célulasRT4 ($1,0 \pm 0,2$ em controle vs. $1,4 \pm 0,2$ em INCB e $1,3 \pm 0,1$ em MT) (Figura 25A).

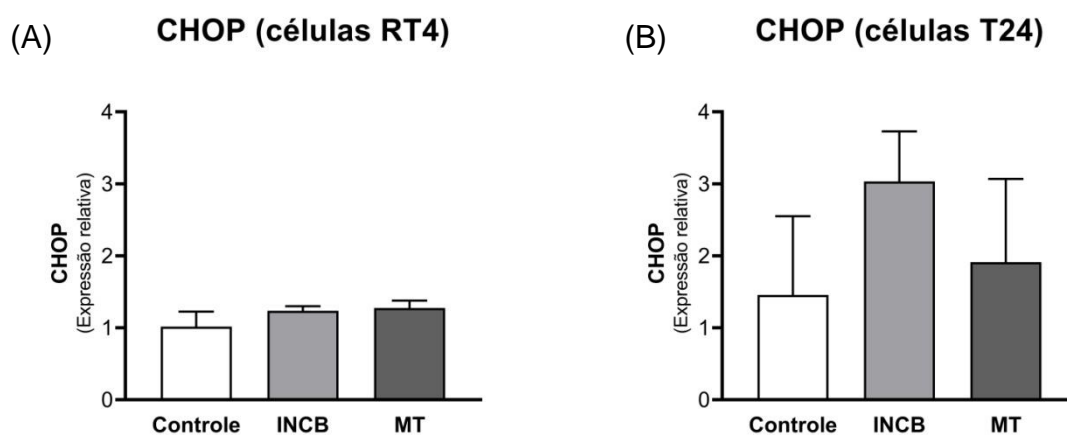


Figura 24. Expressão de CHOP em células RT4 (A) e células T24 (B) incubadas com inibidores químicos daIDO.

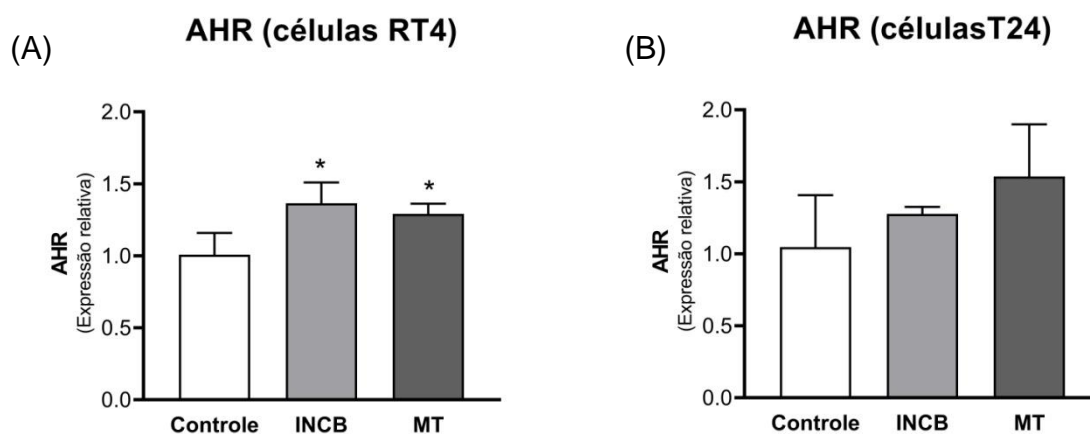


Figura 25. Expressão de AHR em células RT4 (A) e células T24 (B) incubadas com inibidores químicos daIDO.

Em relação à expressão de CYP1A1, por outro lado, pode-se notar aumento significativo com o tratamento com MT em ambas as linhagens celulares (Expressão relativa de $1,00 \pm 0,02$ em controle RT4 vs. $50,3 \pm 8,1$ em MT e $1,0 \pm 0,4$ em controle T24 vs. $7,2 \pm 0,9$ em MT, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 26).

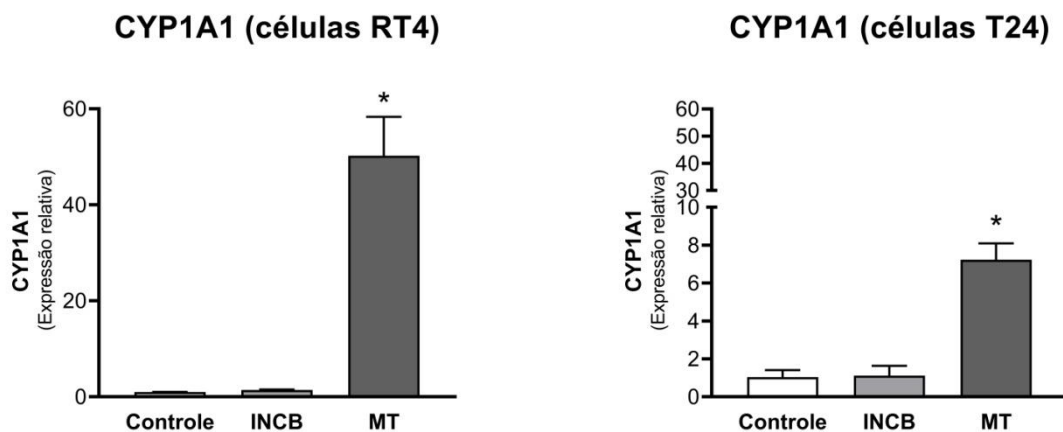


Figura 26. Expressão de CYP1A1 em células RT4 (A) e células T24 (B) estimuladas com IFN- γ e tratadas com inibidores químicos daIDO.

5.3.2 Análise *in vivo*

5.3.2a Efeito do MT sobre a sobrevida

De modo semelhante ao utilizado para avaliar a sobrevida de animais instilados com BCG, também foi comparada a sobrevida de animais tratados com MT (Figura 27). Como é possível observar, o uso de MT também não causou alterações significativas na sobrevida dos animais.

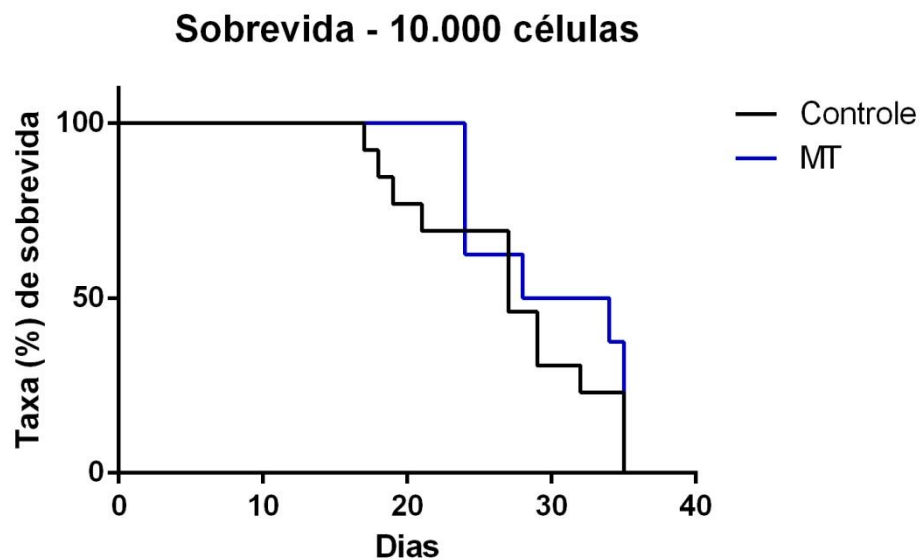


Figura 27. Sobrevida dos animais representada em gráfico Kaplan Meier entre grupos Controle e MT.

5.3.2b Efeito do MT sobre o volume tumoral

Como é possível observar na Figura 28, o tratamento com MT não influenciou o volume tumoral (Figura 28).

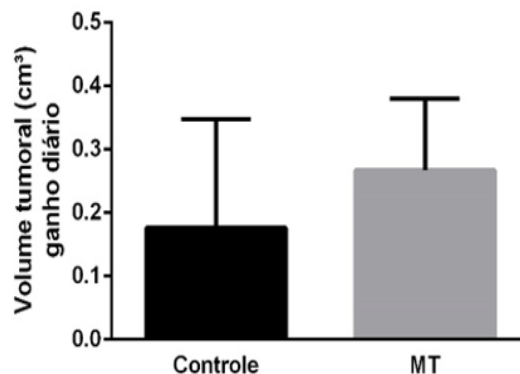


Figura 28. Volume tumoral. Os valores de volume tumorais no dia da eutanásia foram divididos pelo número de dias entre o dia da inoculação e o dia da eutanásia (n=8).

5.3.2c Efeito do MT sobre o número de linfócitos T tumorais

Por fim, foi a influência do uso de MT foi verificada pela contagem de linfócitos no ambiente tumoral. Como é possível observar na Figura 29, não há diferença no número de linfócitos entre animais controle e tratados com MT (Figura 29).

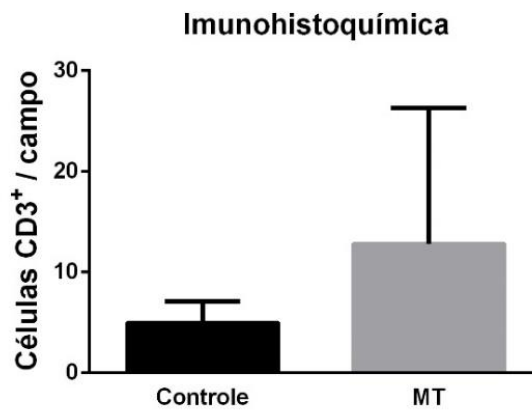


Figura 29. Número de linfócitos T CD3+ por campo. Para esta análise, foram analisados 50 campos de cada caso (n=8).

6 Discussão

AIDO representa o grupo de moléculas com perfil imunomodulador desde que, em 1998, Munn e colaboradores descreveram sua ação na proteção do embrião semi-alogênico contra o sistema imune materno²⁸. Nos últimos anos, sua ação também foi observada em diversos tipos de câncer, colocando-a como um potencial alvo terapêutico sob o espectro definido pelos enunciados “hallmarks of cancer”, em especial o “escape imunológico”. Seguindo essa linha investigativa, grupos começaram a perceber sua importância na evolução de determinados tipos de câncer. Em 2015, Yang e colaboradores⁶⁷ publicaram um estudo mostrando a análise da expressão deIDO em carcinoma urotelial humano, mostrando aumento da expressão deIDO de acordo com o grau de evolução do tumor⁶⁷. Esta hipótese encontrou ainda mais força quando, em 2017, Hudolimn e colaboradores publicaram um estudo com portadores de carcinoma urotelial, correlacionando a expressão deIDO com o grau tumoral⁶⁸.

Seguindo os moldes dos dois trabalhos descritos anteriormente, este estudo buscou caracterizar a expressão daIDO em uma população de indivíduos brasileiros, uma nação tipicamente conhecida por um alto perfil miscigenatório e, portanto, que pode apresentar maior grau de variabilidade genética para a descoberta de perfis estáveis de expressão de determinados fatores. Assim, foi possível realizar a confecção dos blocos de TMA para as análises de imunohistoquímica paraIDO no CB, facilitando em grande escala a etapa de realização dos ensaios e garantindo condições uniformes para a análise da marcação deIDO. Este estudo concentrou-se na marcação deIDO

apenas nas áreas do tecido que correspondiam ao tumor em si, não de concentrando neste momento na análise de IDO em infiltrados inflamatórios que poderiam estar presentes no tumor (uma vez que macrófagos podem expressar IDO). Com a colaboração de uma patologista experiente, foi possível observar e atribuir escores de classificação da expressão de IDO nos tumores. Como resultados da primeira fase, a expressão de IDO correlacionou-se com o estadiamento tumoral, o que corrobora os estudos já mencionados³⁵⁻³⁷. Nossa população apresentou maior expressão de IDO em tumores T1, corroborando o estudo de Hudolimn e colaboradores⁶⁸, onde foi identificada uma maior frequência de casos com alta expressão de IDO em tumores de grau T1 quando comparados aos de classificação T0. Isso pode ser explicado pela maior expressão de IDO em tumores grau 3, estabelecendo a possibilidade de que a indiferenciação das células tenha relação com o perfil concêntrico de instalação tumoral e a IDO tenha participação nesse processo. Os dados encontrados em CB também corroboram achados semelhantes em outros tipos de tumores descritos recentemente, dentre estes, tumores endometriais, de ovário e hepatocelulares⁶⁰⁻⁶². Contudo, diferente do que foi encontrado nos estudos de Yang⁶⁷ e Tsai⁵⁰, não foi observada diferença em relação à recidiva. A ausência de correlação desse fator também foi demonstrada por Hudolin em 2017⁶⁸, o que pode ser justificado pelos diferentes tempos considerados como recidiva, que chegou até cerca de 140 meses de acompanhamento nos estudos realizados por Tsai⁵⁰.

O BCG, dentre outros mecanismos, é capaz de exercer seus efeitos pela ação citotóxica direta exercida no urotélio e sobre células tumorais remanescentes após o procedimento de RTU¹⁵. O objetivo neste trabalho,

entretanto, buscou analisar o possível papel do BCG na modulação da IDO em CB. Para tal, buscamos uma concentração de bacilos com taxa de toxicidade inferior a 20% de mortalidade como meio de minimizar as alterações mediadas por citotoxicidade direta (Anexo 1). Não houve, entretanto, alteração significativa na expressão de IDO em células RT4 ou T24, mesmo em um período após 120h de incubação com BCG. A associação de células de CB com células mononucleares humanas (que expressam IDO naturalmente) excluiu também a possibilidade da modulação de IDO mediada por BCG em CB ser dependente da interação com células do sistema imune.

Em relação aos dados obtidos do modelo *in vivo*, há expressão de IDO nos tumores. Contudo, a expressão de IDO não sofreu influência com tratamento com BCG, mesmo após um período elevado de protocolo (28 dias).

O uso de BCG também não promoveu aumento de IDO em curto prazo em bexiga normal (Anexo 1).

A literatura mostra aumento de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-6 e TNF na urina associadas ao uso de BCG²⁴. Foi demonstrado que o uso de BCG em humanos pode aumentar os níveis de IFN- γ após as primeiras horas pós-instilação¹⁸. Outro estudo, no entanto, mostra aumento de IFN- γ na urina somente após a terceira instilação com BCG⁹³.

A expressão de IDO não sofreu alterações à curta ou longa exposição ao BCG mesmo com possíveis alterações em níveis de citocinas mencionados nos artigos, melhorando a segurança de seu uso como terapia.

Corroborando os achados nos pacientes, nosso grupo demonstrou que células tumorais de CB de grau 1 (RT4) expressam menos IDO do que células invasivas de grau 3 (T24), reforçando a ideia de que quanto mais avançado o tumor, maior a expressão da IDO. Contudo, não se sabe se a IDO tem participação nesse processo ou se aumenta como consequência de outros fenômenos.

A maior expressão de IDO em células T24 é acompanhada de uma maior expressão da ativação das vias GCN2 e AHR, sem alterar a expressão do receptor. O acionamento de ambas as vias mostra que células invasivas de CB são capazes de, ao mesmo tempo, acionar mecanismos de imunomodulação pela depleção do triptofano e acionamento da GCN2, levando a anergia e apoptose dos linfócitos²⁵ quanto pela ativação do AHR.

Essa diferença na expressão do CYP1A1 em células T24 pode ser explicado pela expressão elevada de IDO1 nas mesmas (cerca de 70X maior do que em células RT4), um efeito que seria intermediado pela alta produção de quinureninas, um ligante do AHR⁹⁴.

Reforçando a hipótese de que a quinurenina promove a ativação do AHR, levando ao aumento da expressão do CYP1A1 nas células t24. a quinurenina foi detectável apenas nas células T24 por HPLC.

A AHR tem sido associada não apenas ao início da tumorigênese, mas também à promoção, progressão e metástase⁹⁵, sendo capaz de modular as proteínas de adesão nas células do músculo liso para facilitar a invasão celular⁹⁶. Além disso, a ativação do AHR modula fatores de transcrição responsáveis pela transição epitelial-mesenquimal, aumentando a capacidade

de invasão dos queratinócitos⁹⁷. Essa relação em células de CB será testada futuramente pelo grupo.

Considerando que as células RT4 são representativas das células de CB grau 1 e T24 de CB grau 3, os dados *in vitro* estão de acordo com as descobertas dos conjuntos de dados do GEO, onde os citocromos foram mais expressos em grau 3 do que em grau 1 (Anexo 2).

Corroborando os dados encontrados por Lewis em células tronco mesenquimais⁸⁰, foi possível observar os efeitos do MT aumentando a expressão de CYP1A1, mostrando seu papel na ativação da via AHR também em CB. Já o análogo do INCB024360 é capaz de promover efeito inibitório da IDO sem o acionamento das vias alternativas da IDO, sendo considerado um inibidor de potencial mais completo e específico. Além disso, sua alta eficiência em termos de especificidade de inibição e possibilidade de utilização de uma menor dosagem⁹⁸ podem estabelecer esse inibidor como uma melhor opção para modulação de IDO em ensaios *in vivo*.

O manejo de IDO em tumores de maneira específica e com maior especificidade apresenta uma questão de relevância clínica crescente. Pesquisas recentes vêm demonstrando o papel da IDO em tumores, confirmando-a não só como importante no papel de escape imunológico, mas também em processos que levam à metástase, como a transição epitélio mesenquimal^{50,69,70}.

A IDO configura-se efetivamente como um importante biomarcador para a progressão e acompanhamento de CB e a miríade de fatores modulados por sua ação deve ser levada em conta com cuidado na escolha de fármacos com

poder de modulação de sua ação, garantindo escolhas medicamentosas com foco em eficiência e especificidade, a fim de minimizar efeitos indesejados pelo acionamento de suas vias de forma alternativa, como ocorre com o uso de MT.

7 Conclusões

Em suma, o presente estudo demonstra que:

- 1) A expressão de IDO correlaciona-se com o grau e o estadiamento do CB, podendo ser um biomarcador complementar no prognóstico do CB;
- 2) BCG não induz diretamente a expressão de IDO em CB, reforçando sua segurança como tratamento adjuvante à RTU;
- 3) O MT aciona AHR em CB, assim, seu uso pode trazer risco para portadores de CB, já que esse receptor é associado com a progressão em outros tipos de câncer. O INCB024360 demonstra maior segurança em inibir a IDO em CB, já que não altera as vias GCN2 e AHR.

8 Limitações do estudo

Dificuldades de perfil técnico resultaram em problemas no desenvolvimento inicial da metodologia utilizada inicialmente no trabalho.

Embora o estudo utilizado como base para a metodologia de inoculação de tumor ortotópico utilize o número de 500.000 células MB49 por animal, os animais recebendo esse volume apresentaram, apesar da mencionada alta taxa de sucesso na implantação tumoral, quadros graves de debilidade levando a um *end-point* precoce.

O modelo apresentou-se como de extrema agressividade, com um desenvolvimento tumoral muito acelerado, levando, entre outros, a um processo de oclusão do canal uretral ocasionado pela invasão tumoral. Esse desenvolvimento rápido do tumor impossibilitou que o mesmo desenvolvesse irrigação sanguínea e nutrição adequadas, levando a um processo de necrose do tumor, aumento de inflamação e processo de sepse em alguns casos.

Assim, foram necessárias diversas etapas de testes e padronização do modelo, com redução do número de células infundidas para 250.000, 100.000, 50.000 e finalmente 10.000 células, representando 1/50 do número estabelecido na publicação original. Somente após atingir esse número foi possível garantir que os animais atingissem o fim do período de protocolo de tratamento estabelecido de maneira a respeitar os parâmetros de *end-point* adotados.

Ainda assim, houve, em alguns casos, uma variação no índice de certos marcadores, dificultando os critérios de sua análise devido ao desvio gerado pelas amostras.

Outra intercorrência ao longo do desenvolvimento do trabalho foi a dose de MT utilizada nos animais. Nos baseamos em estudos de farmacocinética e toxicologia estabelecido por Jia e colaboradores⁹¹, com dose de 100mg/kg dos animais. É possível que uma maior dose possa promover efeitos visíveis sobre os fatores investigados, até mesmo gerando efeitos negativos devido ao acionamento de AHR demonstrando pelos experimentos *in vitro*.

Por fim, houve a tentativa de caracterizar a linhagem linfocitária presente nos tumores do modelo. As vias daIDO além de promoverem seus efeitos diretos relacionados ao triptofano, promovem a maturação de linfócitos t “naive” em “Tregs”, que garantem um melhor ambiente de imunoescape ao tumor. Foram testados 3 marcas e clones diferentes, ou mesmo diferentes lotes de anticorpos anti-FOXP3 para caracterização do perfil linfocitário, entretanto, apesar das diversas tentativas de recuperação antigênica ou eliminação de background a técnica histológica não obteve sucesso para a marcação positiva dos casos.

9 Referências Bibliográficas

1. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. and Jemal, A. (2018), Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68: 394-424. doi:10.3322/caac.21492
2. INCA, 2019. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2019.
3. Farling, K. B. (2017). Bladder cancer: Risk factors, diagnosis, and management. *The Nurse Practitioner*, 42(3).
4. BRASIL. Ministério da Saúde. SIM: Sistema de informações sobre mortalidade. Brasília, DF: Ministério da Saúde, c2008b. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em: 5 set. 2019.
5. Kriegmair M, Zaak D, Knuechel R, Baumgartner R, Hofstetter A. Photodynamic cystoscopy for detection of bladder tumors. *Semin Laparosc Surg*. 1999 Jun;6(2):100-3.
6. Cina SJ, Epstein JI, Endrizzi JM, Harmon WJ, Seay TM, Schoenberg MP. Correlation of cystoscopic impression with histologic diagnosis of biopsy specimens of the bladder. *Hum Pathol*. 2001 Jun;32(6):630-7.
7. Lamm DL, Blumenstein BA, Crissman JD, Montie JE, Gottesman JE, Lowe BA, Sarosdy MF, Bohl RD, Barton Grossman H, Beck TM, Liemert JT, David Crawford E: Maintenance bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for recurrent TA, T1 and carcinoma in situ transitional carcinoma of the bladder: a randomized southwest oncology group study. *J Urol* 2000,163:1124–1129.
8. Zlotta AR, Fleshner NE, Jewett MA. The management of BCG failure in non-muscle-invasive bladder cancer: an update. *Can Urol Assoc J*. 2009 Dec;3(6 Suppl 4): S199-205.
9. Malmstrom PU, Sylvester RJ, Crawford DE, et al. An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guerin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2009; 56:247–56.
10. Saint F, Patard JJ, Maille P, Soyeux P, Hoznek A, Salomon L, Abbou CC, Chopin DK. Prognostic value of a T helper 1 urinary cytokine response after intravesical bacillus Calmette-Guerin treatment for superficial bladder cancer. *J Urol*. 2002 Jan;167(1):364-7.
11. Fernandez-Gomez J, Solsona E, Unda M, Martinez-Piñeiro L, Gonzalez M, Hernandez R, Madero R, Ojea A, Pertusa C, Rodriguez-Molina J, Camacho JE, Isorna S, Rabadan M, Astobieta A, Montesinos M, Muntañola P, Gimeno A, Blas M, Martinez-Piñeiro JA; Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico (CUETO). Prognostic factors in patients with non-muscle-invasive

bladder cancer treated with bacillus Calmette-Guérin: multivariate analysis of data from four randomized CUETO trials. *Eur Urol*. 2008 May;53(5):992-1001.

12. Sylvester RJ van der Meijden AP, Oosterlinck W, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol* 2006; 49:466–5.

13. Rosenblatt R, Sherif A, Rintala E, et al. Pathologic downstaging is a surrogate marker for efficacy and increased survival following neoadjuvant chemotherapy and radical cystectomy for muscle-invasive urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 2012; 61:1229–38.

14. Böhle A, Jocham D, Bock PR. Intravesical bacillus Calmette-Guérin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *J Urol*. 2003 Jan;169(1):90-5.

15. Redelman-Sidi, G., Glickman, M. & Bochner, B. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer—a current perspective. *Nat Rev Urol* 11, 153–162 (2014). <https://doi.org/10.1038/nrurol.2014.15>

16. Old, L. J., Clarke, D. A. & Benacerraf, B. Effect of Bacillus Calmette-Guérin infection on transplanted tumours in the mouse. *Nature* 184 (Suppl. 5), 291–292 (1959).

17. Ikeda N, Toida I, Iwasaki A, Kawai K, Akaza H. Surface antigen expression on bladder tumor cells induced by bacillus Calmette-Guérin (BCG): A role of BCG internalization into tumor cells. *Int J Urol*. 2002 Jan;9(1):29- 35.

18. Prescott S, James K, Hargreave TB, Chisholm GD, Smyth JF. Radio-immunoassay detection of interferon-gamma in urine after intravesical Evans BCG therapy. *J Urol*. 1990 Nov;144(5):1248-51. PubMed PMID: 2122008.

19. De Boer EC, De Jong WH, Steerenberg PA, Aarden LA, Tetteroo E, De Groot ER, Van der Meijden AP, Vegt PD, Debruyne FM, Ruitenberg EJ. Induction of urinary interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-6, and tumour necrosis factor during intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guérin in superficial bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 1992;34(5):306-12.

20. De Boer EC, Somogyi L, de Ruiter GJ, de Reijke TM, Kurth KH, Schamhart DH. Role of interleukin-8 in onset of the immune response in intravesical BCG therapy for superficial bladder cancer. *Urol Res*. 1997;25(1):31-4.

21. Gopal R, Lin Y, Obermajer N, Slight S, Nuthalapati N, Ahmed M, Kalinski P, Khader SA. IL-23-dependent IL-17 drives Th1-cell responses following Mycobacterium bovis BCG vaccination. *Eur J Immunol*. 2012 Feb;42(2):364-73.

22. Watanabe E, Matsuyama H, Matsuda K, Ohmi C, Tei Y, Yoshihiro S, Ohmoto Y, Naito K. Urinary interleukin-2 may predict clinical outcome of intravesical bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for carcinoma in situ of the bladder. *Cancer Immunol Immunother*. 2003 Aug;52(8):481-6. Epub 2003 Apr 18.

23. Saint F, Patard JJ, Irani J, Salomon L, Hoznek A, Legrand P, Debois H, Abbou CC, Chopin DK. Leukocyturia as a predictor of tolerance and efficacy of intravesical BCG maintenance therapy for superficial bladder cancer. *Urology*. 2001 Apr;57(4):617-21.
24. Zuiverloon TC, Nieuweboer AJ, Vékony H, Kirkels WJ, Bangma CH, Zwarthoff EC. Markers predicting response to bacillus Calmette-Guérin immunotherapy in high-risk bladder cancer patients: a systematic review. *Eur Urol*. 2012 Jan;61(1):128-45.
25. 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.
26. Yamamoto S, Hayaishi O. Tryptophan pyrrolase of rabbit intestine. D- and L-tryptophan-cleaving enzyme or enzymes. *J Biol Chem*. 1967 Nov 25;242(22):5260-6.
27. Sugimoto, H., Oda, S., Otsuki, T., Hino, T., Yoshida, T., &Shiro, Y. (2006). Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: Catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2611 LP – 2616. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508996103>
28. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*. 1998 Aug 21;281(5380):1191-3.
29. 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 Apr;8(3):237-44. Review.
30. Chen, W. (2011). IDO: more than an enzyme. *Nature Immunology*, 12(9), 809–811. <https://doi.org/10.1038/ni.2088>
31. Dowling RJ, Topisirovic I, Fonseca BD, Sonenberg N. Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. *BiochimBiophys Acta*. 2010 Mar;1804(3):433-9. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.12.001. Epub 2009 Dec 11.
32. Metz R, Rust S, Duhadaway JB, Mautino MR, Munn DH, Vahanian NN, Link CJ, Prendergast GC. IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. *Oncoimmunology*. 2012, 1;1(9):1460-1468.
33. Wagage S, John B, Krock BL, Hall AO, Randall LM, Karp CL, et al. The aryl hydrocarbon receptor promotes IL-10 production by NK cells. *J Immunol* (2014) 192(4):1661–70. doi:10.4049/jimmunol.1300497
34. Merrick WC. Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol Rev*. 1992 Jun;56(2):291-315.

35. Hershey JW. Translational control in mammalian cells. *Annu Rev Biochem.* 1991; 60:717-55.
36. Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, Mellor AL. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity.* 2005 May;22(5):633-42. PubMed PMID:15894280.
37. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, Orabona C, Bianchi R, Belladonna ML, Volpi C, Fioretti MC, Puccetti P. Tryptophan catabolism generates autoimmune-preventive regulatory T cells. *Transpl Immunol.* 2006 Dec;17(1):58-60. Epub 2006 Oct 10.
38. Yan Y, Zhang GX, Gran B, et al. IDO upregulates regulatory T cells via tryptophan catabolite and suppresses encephalitogenic T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2010;185(10):5953–5961. doi:10.4049/jimmunol.1001628
39. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell.* 2003 Mar;11(3):619-33.
40. 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 Nov 1;96(9):3241-8.
41. Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ.* 2004 Apr;11(4):372-80.
42. Forouzandeh F, Jalili RB, Germain M, Duronio V, Ghahary A. Differential immunosuppressive effect of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) on primary human CD4+ and CD8+ T cells. *Mol Cell Biochem.* 2008 Feb;309(1-2):1-7. Epub 2007 Nov 16.
43. Forouzandeh F, Jalili RB, Germain M, Duronio V, Ghahary A. Skin cells, but not T cells, are resistant to indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) expressed by allogeneic fibroblasts. *Wound Repair Regen.* 2008 May-Jun;16(3):379-87.
44. Vogel CF, Goth SR, Dong B, Pessah IN, Matsumura F. Aryl hydrocarbon receptor signaling mediates expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. *BiochemBiophys Res Commun.* 2008 Oct 24;375(3):331-5.
45. Litzemberger UM, Opitz CA, Sahm F, Rauschenbach KJ, Trump S, Winter M, Ott M, Ochs K, Lutz C, Liu X, Anastasov N, Lehmann I, Höfer T, von Deimling A, Wick W, Platten M. Constitutive IDO expression in human cancer is sustained by an autocrine signaling loop involving IL-6, STAT3 and the AHR. *Oncotarget.* 2014 Feb 28;5(4):1038-51.
46. Opitz, C A; Litzemberger, U M; Sahm, F; Ott, M; Tritschler, I; Trump, S; Schumacher, T; Jestaedt, L; Schrenk, D; Weller, M; Jugold, M; Guillemin, G J; Miller, C L; Lutz, C; Radlwimmer, B; Lehmann, I; von Deimling, A; Wick, W; Platten, M. (2011). An endogenous ligand of the human aryl hydrocarbon

- receptor promotes tumor formation. Department of Neurooncology, Neurology Clinic and National Center for Tumor Diseases Neuropathology, Institute of Pathology, University Hospital of Heidelberg and Cl. 478, 197–203. http://www.zora.uzh.ch/id/eprint/50509/1/Nature_article_final.pdf
47. DiNatale BC, Schroeder JC, Francey LJ, Kusnadi A, Perdew GH. Mechanistic insights into the events that lead to synergistic induction of interleukin 6 transcription upon activation of the aryl hydrocarbon receptor and inflammatory signaling. *J Biol Chem*. 2010 Aug 6;285(32):24388-97.
48. Androutsopoulos, V. P., Tsatsakis, A. M., & Spandidos, D. A. (2009). Cytochrome P450 CYP1A1: Wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer*, 9, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-187>
49. Gramatzki D, Pantazis G, Schittenhelm J, Tabatabai G, Köhle C, Wick W, Schwarz M, Weller M, Tritschler I. Aryl hydrocarbon receptor inhibition downregulates the TGF-beta/Smad pathway in human glioblastoma cells. *Oncogene*. 2009 Jul 16;28(28):2593-605.
50. Tsai CH, Li CH, Cheng YW, Lee CC, Liao PL, Lin CH, Huang SH, Kang JJ. The inhibition of lung cancer cell migration by AHR-regulated autophagy. *Sci Rep*. 2017 Feb 14; 7:41927.
51. Ishida M, Mikami S, Shinojima T, Kosaka T, Mizuno R, Kikuchi E, Miyajima A, Okada Y, Oya M. 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 Jul 15;137(2):299-310.
52. Platten M, Wick W, Van den Eynde BJ. Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion. *Platten Cancer Res*. 2012 Nov 1;72(21):5435-40.
53. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3- dioxygenase. *Nat Med*. 2003 Oct;9(10):1269-74.
54. Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, SutantoWard, E. & Prendergast GC. Inhibition of indoleamine 2,3- dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nature Med* 11, 312–319, 2005.
55. Chang, M. Y. et al. Bin1 ablation in mammary gland delays tissue remodeling and drives cancer progression. *Cancer Res* 67, 100–107, 2007.
56. Ge K, et al. Loss of heterozygosity and tumor suppressor activity of Bin1 in prostate carcinoma. *Int. J. Cancer* 86, 155–161, 2000.
57. Ge K, et al. Losses of the tumor suppressor BIN1 in breast carcinoma are frequent and reflect deficits in programmed cell death capacity. *Int J Cancer* 85, 376–383, 2000.

58. Tajiri T, et al. Expression of a MYCN-interacting isoform of the tumor suppressor BIN1 is reduced in neuroblastomas with unfavorable biological features. *Clin Cancer Res* 9, 3345–3355, 2003.
59. Ge K, et al. Mechanism for elimination of a tumor suppressor: aberrant splicing of a brain-specific exon causes loss of function of Bin1 in melanoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 9689–9694, 1999.
60. Ino K, Yoshida N, Kajiyama H, Shibata K, Yamamoto E, Kidokoro K, Takahashi N, Terauchi M, Nawa A, Nomura S, Nagasaka T, Takikawa O, Kikkawa F: Indoleamine 2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer. *Br J Cancer* 95: 1555-15661, 2006.
61. Takao M, Okamoto A, Nikaido T, Urashima M, Takakura S, Saito M, Saito M, Okamoto S, Takikawa O, Sasaki H, Yasuda M, Ochiai K, Tanaka T: 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* 17: 1333-1339, 2007.
62. Pan K, Wang H, Chen MS, Zhang HK, Weng DS, Zhou J, Huang W, Li JJ, Song HF, Xia JC: Expression and prognosis role of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 134: 1247-1253, 2008.
63. Ishio T, et al. Immunoactivative role of indoleamine 2,3-dioxygenase in human hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol Hepatol* 19,319–326,2004.
64. Riesenber R, 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* 13,6993–7002, 2007.
65. Feder-Mengus C, Wyler S, Hudolin T, Ruzsat R, Bubendorf L, Chiarugi A, Pittelli M, Weber WP, A, Gasser TC, Sulser T, Heberer M, Spagnoli GC, Provenzano M. High expression of indoleamine 2,3-dioxygenase gene in prostate cancer. *Eur J Cancer*. 2008 Oct;44(15):2266-75.
66. Moreno, A. C. R., Porchia, B. F. M. M., Pagni, R. L., Souza, P. da C., Pegoraro, R., Rodrigues, K. B., Barros, T. B., Aps, L. R. d. M. M., de Araújo, E. F., Calich, V. L. G., & Ferreira, L. C. d. S. (2018). The Combined Use of Melatonin and an Indoleamine 2,3-Dioxygenase-1 Inhibitor Enhances Vaccine-Induced Protective Cellular Immunity to HPV16-Associated Tumors. *Frontiers in Immunology*, 9(August), 1914. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01914>
67. 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 Feb 1;8(2):1768-75.
68. Hudolin, T., Mengus, C., Coulot, J., Kastelan, Z., El-Saleh, A., & Spagnoli, G. C. (2017). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase gene is a feature of poorly differentiated non-muscle-invasive urothelial cell bladder carcinomas. *Anticancer Research*, 37(3), 1375–1380. <https://doi.org/10.21873/anticanres.11458>

69. Brito RB, Malta CS, Souza DM, 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. Published 2015 Aug 12. doi: 10.1371/journal.pone.0134858
70. Zhang, W., Zhang, J., Zhang, Z., Guo, Y., Wu, Y., Wang, R., Wang, L., Mao, S., & Yao, X. (2019). Overexpression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition by Activation of the IL-6/STAT3/PD-L1 Pathway in Bladder Cancer. *Translational Oncology*, 12(3), 485–492. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.11.012>
71. Chu, C. E., Porten, S. P., Grossfeld, G. D., & Meng, M. V. (2020). Role of Indoleamine-2,3-Dioxygenase Inhibitors in Salvage Therapy for Non-Muscle Invasive Bladder Cancer. *Urologic Clinics of North America*, 47(1), 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2019.09.013>
72. Moreau, Maïté et al. "Inoculation of Bacillus Calmette-Guerin to mice induces an acute episode of sickness behavior followed by chronic depressive-like behavior." *Brain, behavior, and immunity* vol. 22,7 (2008): 1087-95. doi: 10.1016/j.bbi.2008.04.001
73. Moreau M, Lestage J, Verrier D, Mormede C, Kelley KW, Dantzer R, Castanon N. Bacille Calmette-Guérin inoculation induces chronic activation of peripheral and brain indoleamine 2,3-dioxygenase in mice. *J Infect Dis*. 2005 Aug 1;192(3):537-44.
74. O'Connor JC, André C, Wang Y, Lawson MA, Szegedi SS, Lestage J, Castanon N, Kelley KW, Dantzer R. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. *J Neurosci*. 2009 Apr 1;29(13):4200-9.
75. O'Connor JC, Lawson MA, André C, Briley EM, Szegedi SS, Lestage J, Castanon N, Herkenham M, Dantzer R, Kelley KW. Induction of IDO by bacille Calmette-Guérin is responsible for development of murine depressive-like behavior. *J Immunol*. 2009 Mar 1;182(5):3202-12.
76. Vijaya Kumar K, Rudra A, Sreedhara MV, Siva Subramani T, Prasad DS, Das ML, Murugesan S, Yadav R, Trivedi RK, Louis JV, Li YW, Bristow LJ, Naidu PS, Vikramadithyan RK. Bacillus Calmette-Guérin vaccine induces a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI)-resistant depression like phenotype in mice. *Brain Behav Immun*. 2014 Nov; 42:204-11.
77. Tanner R, Kakalacheva K, Miller E, Pathan AA, Chalk R, Sander CR, Scriba T, Tameris M, Hawkridge T, Mahomed H, Hussey G, Hanekom W, Checkley A, McShane H, Fletcher HA. Serum indoleamine 2,3- dioxygenase activity is associated with reduced immunogenicity following vaccination with MVA85A. *BMC Infect Dis*. 2014 Dec 3;14(1):660.
78. Kamat, A. M., Flaig, T. W., Grossman, H. B., Konety, B., Lamm, D., O'Donnell, M. A., Uchio, E., Efstathiou, J. A., & Taylor, J. A. (2015). Expert consensus document: Consensus statement on best practice management

- regarding the use of intravesical immunotherapy with BCG for bladder cancer. *Nature Reviews Urology*, 12(4), 225–235. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2015.58>
79. Clinical Trials for IDO inhibitors. (2019). <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=IDO+inhibitor&cntry=&state=&city=&dist=&Search=Search>
80. Lewis HC, Chinnadurai R, Bosinger SE, Galipeau J. The IDO inhibitor 1-methyl tryptophan activates the aryl hydrocarbon receptor response in mesenchymal stromal cells. *Oncotarget*. 2017 Aug 10;8(54):91914-91927.
81. Soliman HH, Jackson E, Neuger T, Dees EC, Harvey RD, Han H, et al. A first in man phase I trial of the oral immunomodulator, indoximod, combined with docetaxel in patients with metastatic solid tumors. *Oncotarget* 2014;5:8136–46.
82. Yue EW, Douty B, Wayland B, Bower M, Liu X, Leffert L, et al. potent competitive inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase with in vivo pharmacodynamic activity and efficacy in a mouse melanoma model. *J Med Chem* 2009; 52:7364–7.
83. Spranger S, Koblisch HK, Horton B, Scherle PA, Newton R, Gajewski TF. Mechanism of tumor rejection with doublets of CTLA-4, PD-1/PD-L1, or IDO blockade involves restored IL-2 production and proliferation of CD8 (b) T cells directly within the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer* 2014; 2:3.
84. Rose S. Epcadostat shows value in two SCCHN trials. *Cancer Disc* 2017;7: OF2.
85. Gangadhar TC, Hamid O, Smith DC, Bauer TM, Wasser JS, Olszanski AJ, et al. Epcadostat plus pembrolizumab in patients with advanced melanoma and select solid tumors: updated phase 1 results from ECHO-202/ KEYNOTE-037. *Ann Oncol* 2016; 27:379–400.
86. Perez RP, Riese MJ, Lewis KD, Saleh MN, Daud A, Berlin J, et al. Epcadostat plus nivolumab in patients with advanced solid tumors: preliminary phase I/II results of ECHO-204. *J Clin Oncol* 2017; 35:3003.
87. Long, G. V, Dummer, R., Hamid, O., Gajewski, T. F., Caglevic, C., Dalle, S., Arance, A., Carlino, M. S., Grob, J.-J., Kim, T. M., Demidov, L., Robert, C., Larkin, J., Anderson, J. R., Maleski, J., Jones, M., Diede, S. J., & Mitchell, T. C. (2019). Epcadostat plus pembrolizumab versus placebo plus pembrolizumab in patients with unresectable or metastatic melanoma (ECHO-301/KEYNOTE-252): a phase 3, randomised, double-blind study. *The Lancet Oncology*, 20(8), 1083–1097. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30274-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30274-8)
88. Dobek GL, Godbey WT. An orthotopic model of murine bladder cancer. *J Vis Exp*. 2011 Feb 6;(48). pii: 2535.
89. Wang J, Wakeham J, Harkness R, Xing Z. Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *J Clin Invest*. 1999;103(7):1023–1029. doi:10.1172/JCI6224

90. Canada. (1968). CCAC Guidelines. In Canadian Council on Animal Welfare. http://www.ccac.ca/en_/standards/guidelines
91. Xiangdong Liu, Niu Shin, Holly K. Koblisch, Gengjie Yang, Qian Wang, Kathy Wang, Lynn Leffet, Michael J. Hansbury, Beth Thomas, Mark Rupar, Paul Waeltz, Kevin J. Bowman, Padmaja Polam, Richard B. Sparks, Eddy W. Yue, Yanlong Li, Richard Wynn, Jordan S. Fridman, Timothy C. Burn, Andrew P. Combs, Robert C. Newton, Peggy A. Scherle; Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity. *Blood* 2010; 115 (17): 3520–3530. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-246124>
92. Jia L, Schweikart K, Tomaszewski J, Page JG, Noker PE, Buhrow SA, Reid JM, Ames MM, Munn DH. Toxicology and pharmacokinetics of 1-methyl-d-tryptophan: absence of toxicity due to saturating absorption. *Food Chem Toxicol.* 2008 Jan;46(1):203-11.
93. Jackson, A M et al. “Changes in urinary cytokines and soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in bladder cancer patients after bacillus Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy.” *Clinical and experimental immunology* vol. 99,3 (1995): 369-75. doi:10.1111/j.1365-2249.1995.tb05560.x
94. Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Burlingham WJ, Bradfield CA. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol.* 2010;185(6):3190–3198.
95. Murray IA, Patterson AD, Perdew GH. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(12):801–814.
96. Niermann T, Schmutz S, Erne P, Resink T. Aryl hydrocarbon receptor ligands repress T-cadherin expression in vascular smooth muscle cells. *BiochemBiophys Res Commun.* 2003;300(4):943–949.
97. Ikuta T, Kawajiri K. Zinc finger transcription factor Slug is a novel target gene of aryl hydrocarbon receptor. *Exp Cell Res.* 2006;312(18):3585–3594.
98. Yue EW, Sparks R, Polam P, Modi D, Douty B, Wayland B, et al. INCB24360 (epacadostat), a highly potent and selective indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitor for immuno-oncology. *ACS MedChemLett*2017; 8:486–91.

10 Anexos

Anexo 1 - Resultados complementares

Estabelecimento da concentração de BCG a ser usada nas culturas

A toxicidade direta de BCG (Cepa Moreau, fabricado pela Fundação Ataulpho de Paiva, Rio de Janeiro, Brasil) foi avaliada, em modelo “*in vitro*”, sobre células T24.

As células foram cultivadas de acordo com os procedimentos de rotina já descritos e após atingirem aproximadamente 80% de confluência, foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de 6 poços (Corning, USA), com 100.000 células por poço.

Após 24h, foram incubadas com diferentes concentrações de BCG por célula (0,01, 0,1, 1, 10 e 100 bacilos/célula), por diferentes períodos (1h, 6h, 12h, 24h e 48h) em meio RPMI com 1%SFB, sem antibióticos.

Não foi possível observar toxicidade em incubações realizadas com 1h, 6h e 12h. Entretanto, como podemos observar na Figura 30, a proporção de 100/1 BCG/T24 aumentou a mortalidade das células T24 após 24h (Figura 30A) e as proporções de 10/1 e 100/1 BCG/T24 foram tóxicas para as células T24 após 48 horas de incubação (Figura 30B), enquanto as proporções 0,01/1, 0,1/1 e 1/1 não apresentaram toxicidade em nenhum tempo de incubação.

Por meio deste experimento, foi definida a proporção de 1/1 para os outros experimentos em incubações de 48h em todas as linhagens utilizadas,

para que a diferença na concentração do bacilo não representasse fator de diferença entre as linhagens.

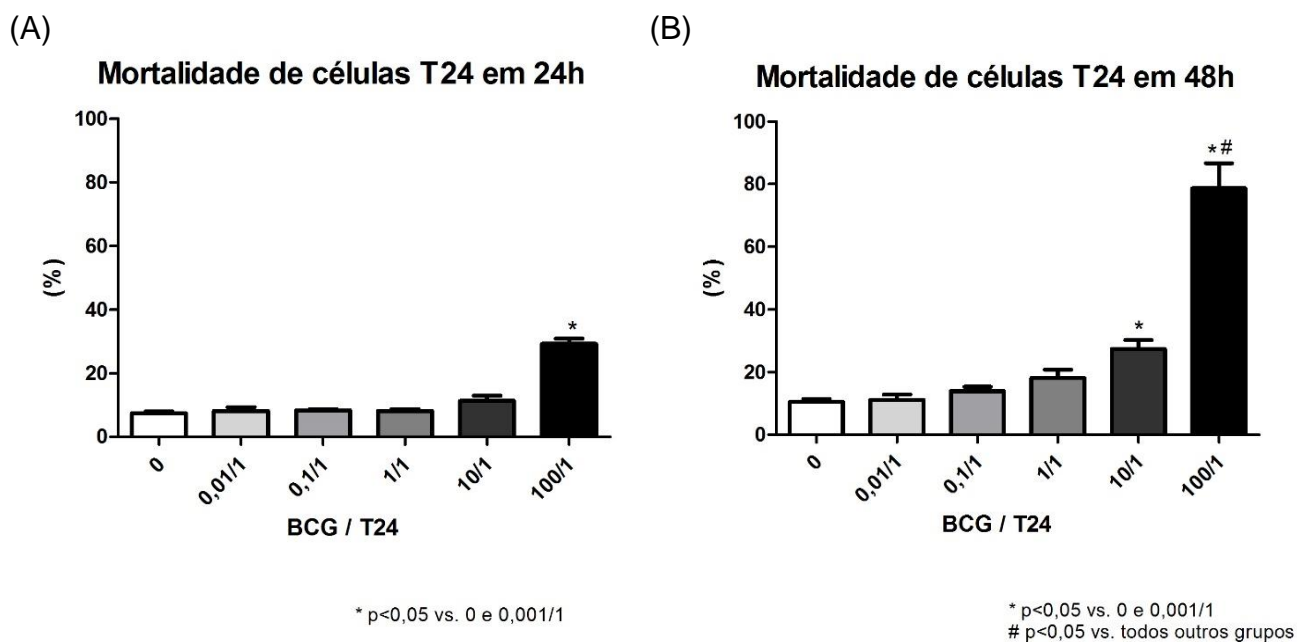


Figura 30. Efeito da incubação de BCG sobre a mortalidade de células T24 em 24 h (A) e em 48 h (B).

Validação da capacidade de endocitose do BCG sobre linhagem murina MB49

Para verificar se os bacilos tinham capacidade de endocitose em células tumorais murinas, confirmando sua ação sobre o modelo tumoral e comprovando a ausência de efeito do bacilo sobre a expressão de IDO encontrada, foi realizado modelo in vitro de endocitose do bacilo.

Foram realizadas incubações de MB49 com BCG durante 24 horas. A Figura 31 ilustra as células MB49 incubadas com BCG.

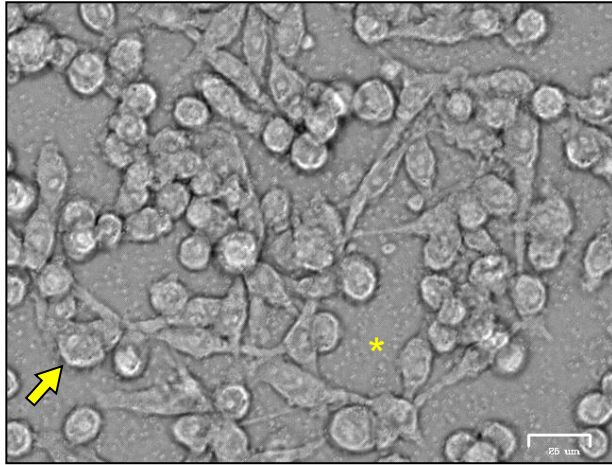


Figura 31. Incubação de células MB49 com BCG. Microscopia óptica invertida. A seta indica célula MB49 e o asterisco indica uma área intercelular com inúmeros bacilos.

A presença de bacilos vivos foi no interior de células MB49 e a expressão de IDO foram avaliadas por meio de fluorescência. Os bacilos foram marcados com fluoróforo vermelho. Após 24 horas de incubação, pudemos observar que os bacilos foram endocitados pelas células MB49 e permaneceram viáveis (Figura 32).

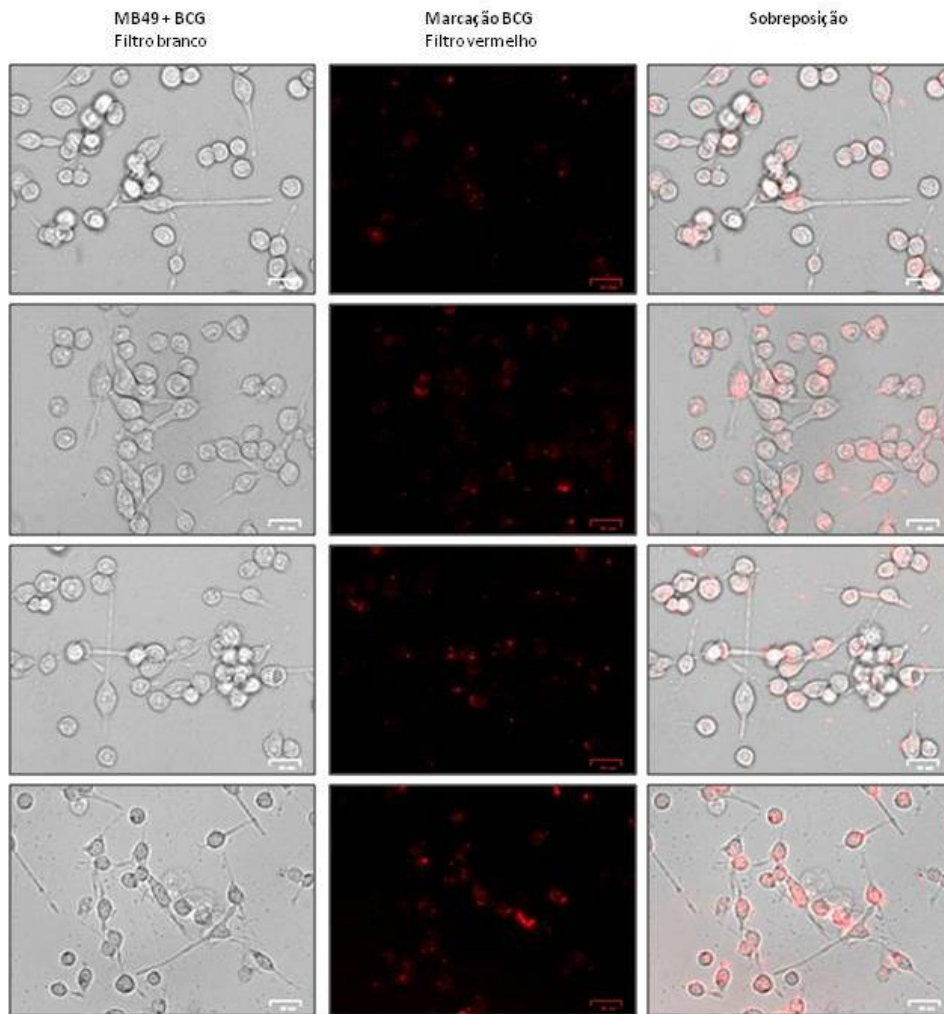


Figura 32. Imunofluorescência para identificação de BCG (vermelho). Na coluna da esquerda, há imagens de células MB49 incubadas com BCG, extraídas com filtro branco. Na coluna do meio, imagens capturadas com filtro vermelho, evidenciando-se os bacilos em vermelho. Já na coluna da direita, os bacilos aparecem no interior das células MB49, a partir da sobreposição de imagens.