



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA

Guilherme Falato Cecconi

RA: 616150095

Meta-análise de bancos de *microarray* para avaliação da expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase e de genes relacionados à via do receptor de hidrocarboneto de arila em câncer de bexiga

SÃO PAULO, SP

2018

GUILHERME FALATO CECCONI

Meta-análise de bancos de *microarray* para avaliação da expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase e de genes relacionados à via do receptor de hidrocarboneto de arila em câncer de bexiga

Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho para obtenção do título de Mestre em Medicina.

Orientador: Prof. Humberto Dellê

**SÃO PAULO, SP
2018**

São Paulo, 09 de Maio de 2018.


TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: GUILHERME FALATO CECCONI.

Título da Dissertação: "Meta-Análise de bancos de Microarray para avaliação da expressão de Indoleamina 2,3- Dioxigenase e de Genes relacionados á via do Receptor de Hidrocarboneto de Arila em câncer de bexiga".

Presidente: PROF. DR. HUMBERTO DELLÉ  _____

Membro: PROF. DR. JEAN PIERRE SCHATZMANN PERON  _____

Membro: PROF. DR. CLEBER PINTO CAMACHO  _____

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	6
1.1 Câncer de Bexiga.....	6
1.2 Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO).....	9
1.3 IDO no câncer.....	11
1.4 IDO no câncer de bexiga.....	12
1.5 IDO e receptor de hidrocarboneto de arila (AHR).....	14
1.6 Racional do estudo.....	16
2 OBJETIVOS.....	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Da seleção dos bancos.....	19
3.1a Validação com banco de tecidos normais.....	19
3.1b Análise de tecido vesical normal <i>versus</i> câncer de bexiga.....	20
3.1c Análise da sobrevida dos pacientes.....	22
3.2 Análise estatística.....	23
4 RESULTADOS	
4.1 Correlação entre <i>IDO</i> , <i>INF-gama</i> , <i>AHR</i> e <i>CYP1A1</i> em tecidos humanos normais.....	24
4.2 Comparação da expressão de <i>IDO</i> , <i>INF-gama</i> , <i>AHR</i> e <i>CYP1A1</i> entre tecido vesical normal e câncer de bexiga.....	26
4.3 Comparação da expressão de <i>IDO</i> , <i>INF-gama</i> , <i>AHR</i> e <i>CYP1A1</i> entre tecido vesical normal e CBNMI.....	28
4.4 Comparação da expressão de <i>IDO</i> , <i>INF-gama</i> , <i>AHR</i> e <i>CYP1A1</i> entre tecido vesical normal e CBMI.....	30
4.5 Comparação da expressão de <i>IDO</i> , <i>INF-gama</i> , <i>AHR</i> e <i>CYP1A1</i> entre CBNMI e CBMI.....	32
4.6 Análise de correlação entre a expressão de <i>IDO</i>	

<i>e INF-gama, AHR e CYP1A1</i>	34
4.7 Análise de correlação da série GSE13507.....	36
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	47
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

Lista de Figuras

Figura 1.....	20
Figura 2.....	21
Figura 3.....	25
Figura 4.....	36
Figura 5.....	37

Lista de Tabelas

Tabela 1.....	8
Tabela 2.....	22
Tabela 3.....	24
Tabela 4.....	27
Tabela 5.....	29
Tabela 6.....	31
Tabela 7.....	33
Tabela 8.....	35

Resumo

O câncer de bexiga é uma das neoplasias mais comuns no homem, sendo responsável por alta morbidade e mortalidade, mesmo frente aos clássicos protocolos terapêuticos. A imunoterapia está emergindo como uma estratégia promissora para o tratamento do câncer de bexiga. Dentre as moléculas candidatas está a indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), uma enzima reconhecida como imunomoduladora desde que foi descrita em placenta protegendo o embrião contra o sistema imune materno. Inibidores químicos da IDO têm sido propostos na área de oncologia para que o escape imunológico dos tumores seja vencido. Sendo o $INF-\gamma$ seu principal indutor, a IDO atua, dentre outros mecanismos, pelo acionamento do receptor de hidrocarboneto de arila (AHR). Contudo, há pouco estudo da IDO em câncer de bexiga e os estudos que investigaram a expressão de IDO em tumores gerais mostram que a enzima está presente na maioria das neoplasias, porém há alta variabilidade entre indivíduos.

O objetivo do presente estudo foi analisar a expressão de *IDO*, *INF- γ* , *AHR* e *CYP1A1* (marcador da ativação do AHR) em espécimes de tecido vesical normal e de tumor de bexiga não-músculo invasivo (CBNMI) e músculo invasivo (CBMI), a fim de verificar a possibilidade da IDO ser apontada como alvo terapêutico neste tipo de neoplasia.

A metodologia baseou-se na análise de bancos de dados (séries) de *microarray* publicados no NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) e viabilizados via GEO Datasets (*Gene Expression Omnibus*). Para tanto, foi usado o descritor “Bladder cancer”. Em um primeiro momento, foram selecionadas séries que oferecessem análise de tecidos humanos normais para a validação da correlação entre os genes analisados. Em seguida, foram selecionadas séries que oferecessem análise de tecido vesical normal versus câncer de bexiga ou entre CBNMI versus CBMI. De 3.110 séries selecionadas com o descritor “bladder cancer”, 123 eram estudos de *microarray* e 12 ofereceram as análises de interesse. A análise estatística foi realizada pelo aplicativo GEO2R oferecido pela própria plataforma do GEO Datasets, que usa o método estatístico *limma* 3.26.8. Análises de correlação e de sobrevida (apenas uma série) foram realizadas pelo programa SPSS versão 22.

Como resultados, há correlação positiva entre os genes analisados tratando-se de tecidos normais, tais como placenta, linfonodo e intestino. Das oito séries que ofereceram comparação entre tecido vesical normal e câncer de bexiga, nenhuma apresentou diferença na expressão de *IDO*, *INF- γ* e *CYP1A1*. Em apenas uma série houve aumento de *AHR* em câncer de bexiga. O mesmo perfil foi encontrado comparando-se tecido vesical normal versus CBNMI ou CBMI. Na comparação entre CBNMI e CBMI, houve aumento da expressão de *IDO* em duas das 8 séries, sendo aumentado o *CYP1A1* também em uma delas. Na análise de correlação, em apenas aproximadamente 50% das séries a *IDO* correlacionou-se com *INF- γ* , *AHR* e *CYP1A1*. Houve correlação negativa entre a expressão de *IDO* e a sobrevida dos pacientes em uma das séries, porém a análise de Kaplan Meier não mostrou diferença entre o grupo com baixa expressão de *IDO* e o grupo com alta expressão.

Os resultados demonstram que a expressão de *IDO* pode estar aumentada no câncer de bexiga, porém há grande variabilidade entre indivíduos. No câncer de bexiga, a relação entre os genes estudados não se mantém de forma estável como ocorre em tecidos normais. O estudo aponta para a importância da caracterização da via IDO-AHR nos pacientes com câncer de bexiga, a fim de instituir uma imunoterapia personalizada.

Palavras-chave: Câncer de bexiga, Imunomodulação; Indoleamina 2,3-dioxigenase; Triptofano

Abstract

Bladder cancer (BC) is one of the most common neoplasms in man, accounting for high morbidity and mortality, even having classic therapeutic protocols. Immunotherapy is emerging as a promising strategy for the treatment of BC. Among the candidate molecules is indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), an enzyme recognized as immunomodulatory since it has been described in placenta protecting the embryo against the maternal immune system. IDO chemical inhibitors have been proposed in the area of oncology so that the immune escape of tumors is overcome. Since INF- γ is its main inductor, IDO acts by the activation of the aryl hydrocarbon receptor (AHR). However, there is little IDO study in bladder cancer and studies investigating the expression of IDO in general tumors show that the enzyme is present in most neoplasms, but there is high variability among individuals. The aim of the present study was to analyze the expression of IDO, INF- γ , AHR and CYP1A1 (marker of AHR activation) in normal and non-muscle invasive bladder tumor (CBNMI) and invasive muscle (CBMI), in order to verify the possibility of IDO being targeted as a therapeutic target in this type of neoplasia. The method was based on the analysis of databases (series) of microarray published in NCBI (National Center of Biotechnology Information) and made via GEO Datasets (Gene Expression Omnibus). For this, the descriptor "Bladder cancer" was used. At first, we selected series that offered analysis of normal human tissues for the validation of the correlation between the genes analyzed. Next, we selected series that offered analysis of normal bladder versus bladder cancer or between CBNMI versus CBMI. Of 3,110 series selected with the descriptor "bladder cancer", 123 were microarray studies and 12 offered the analyzes of interest. The statistical analysis was performed by the GEO2R application offered by the GEO Datasets platform, which uses the statistical method. Correlation and survival analyzes (only one series) were performed by the SPSS program version 22. As results, there is a positive correlation between the genes analyzed for normal tissues such as placenta, lymph node and intestine. Of the eight series that offered comparison between normal bladder and bladder cancer, none showed differences in the expression of IDO, INF- γ and CYP1A1. In only one series was there an increase in AHR in bladder cancer. The same profile was found by comparing normal bladder tissue versus CBNMI or CBMI. In the comparison between CBNMI and CBMI, there was an increase in the expression of IDO in two of the 8 series, and CYP1A1 was also increased in one of them. In correlation analysis, in only approximately 50% of the series the IDO correlated with INF- γ , AHR and CYP1A1. There was a negative correlation between IDO expression and patient survival in one of the series, but the Kaplan Meier analysis showed no difference between the group with low IDO expression and the high expression group. The results demonstrate that IDO expression may be increased in BC, but there is great variability among individuals. In BC, the relationship between the genes studied does not hold steady as it does in normal tissues. The study points to the importance of characterizing the IDO-AHR pathway in patients with BC in order to institute personalized immunotherapy.

Keywords: Bladder câncer;Immunomodulation;Indoleamine 2,3-dioxygenase;Tryptophan

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que serão 14.000.000 novos casos de câncer no mundo a cada ano que se inicia, sendo que 60% destes acometerão países em desenvolvimento e 8.000.000 serão prováveis óbitos nos mesmos países.¹⁻³ A nona posição mundial é ocupada pelo câncer de bexiga.¹⁻³

1.1 Câncer de Bexiga

No cenário brasileiro, o câncer de bexiga tem uma incidência 3-4 vezes maior nos homens quando comparados às mulheres. A Região Sudeste possui a maior incidência da doença.¹⁻³

A forma mais comum desta doença é o carcinoma urotelial (90%), também conhecido como carcinoma de células transicionais, onde a relação está diretamente ligada à infecção por *Schistosoma haematobium*, ou determinada por outros fatores de risco como: tabagismo (6 vezes maior quando comparados aos não fumantes), exposição às aminas aromáticas tais como benzidina, 4-aminobifenil e 4-cloro-toluidino, à hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, formaldeídos e solventes.

Sabe-se que 70% dos casos de câncer de bexiga são tumores não-músculo invasivos (CBNMI): Ta (superficial), T1 (invasão submucosa) e Tis (carcinoma *in situ*). A taxa de recorrência do carcinoma NMI é de 40-80% em 6-12

meses após a ressecção transuretral isolada (RTU isolada), sendo a taxa de progressão 10-25%.⁴

Há três tipos de câncer que começam nas células que revestem a bexiga. A classificação se dá de acordo com as células que sofrem a alteração maligna:

- **Carcinoma de células de transição:** representa a maioria dos casos e começa nas células uroteliais;
- **Carcinoma de células escamosas:** afetam as células delgadas e planas que podem surgir na bexiga depois de infecção ou irritação prolongadas;
- **Adenocarcinoma:** se inicia nas células glandulares (de secreção) que podem se formar na bexiga depois de um longo tempo de irritação ou inflamação.

Quando o câncer se limita ao tecido de revestimento da bexiga, é chamado de superficial. O câncer que começa nas células de transição pode se disseminar através do revestimento da bexiga, invadir a parede muscular e disseminar-se até os órgãos próximos ou gânglios linfáticos, transformando-se num câncer invasivo (CBMI). Em estudo publicado em 2010, Williams e colaboradores enfatizam que cerca de 45% dos casos submetidos a RTU irão recorrer em até 1 ano para as formas invasivas (T2, T3 e T4), sugerindo estar relacionado a tumores microscópicos e/ou remanescente de células tumorais.⁵

Tabela 1: Classificação TNM para os tumores de bexiga.

Tabela de Classificação TNM para os tumores de bexiga
Tumor Primário
Ta Carcinoma papilar não músculo invasivo
Tis Carcinoma <i>in situ</i> : “tumor plano”
T1 Tumor invade o tecido conjuntivo subepitelial
T2 Tumor invade a camada muscular
T2a Camada muscular superficial (interna)
T2b Camada muscular profunda (externa)
T3 Tumor invade o tecido perivesical (além da camada muscular)
T3a Invasão microscópica
T3b Invasão macroscópica (massa extravesical)
T4 Tumor invade quaisquer das seguintes estruturas: próstata, útero, vagina, parede pélvica, parede abdominal
T4a Próstata, útero ou vagina
T4b Parede pélvica ou parede

Fonte: Diretrizes para o câncer de bexiga Não Músculo Invasivo, 2010

Uma das terapias já consagradas no tratamento adjuvante do câncer de bexiga é a utilização de BCG (Bacilo Calmette-Guérin). Tal terapia vem associada para os CBNMI, quando estes apresentam risco intermediário ou alto risco para recorrência ou progressão da doença e também para os casos com Tis, levando em conta recorrência em curto período. Tumor de estágio patológico T1 e Tis são indicativos de uma chance maior de recorrência e da necessidade de um tratamento complementar com BCG.⁶

O mecanismo de ação desta micobactéria ainda é considerado muito complexo, mas tem como estrutura básica a apresentação de antígenos pelos

fagócitos às células auxiliares. Tal exposição ao BCG provoca o aumento do infiltrado mononuclear, constituído por células T e macrófagos, aumentando a expressão de interferon- γ (INF- γ).⁷

1.2 Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO)

A IDO foi descrita pela primeira vez em intestino de coelho, na década de 60,⁸ tendo sido relacionada à proteção do organismo contra a invasão e disseminação de microparasitas,⁹ particularmente por tornar o microambiente desfavorável à proliferação destes microorganismos.⁹ A produção de IDO em macrófagos estrategicamente localizados evidencia o papel da enzima no ataque contra estes microorganismos. Acreditava-se que a indução de um microambiente desfavorável estivesse relacionada exclusivamente à atividade da IDO em depletar o aminoácido essencial triptofano do microambiente. Atualmente, é consenso que os produtos da degradação do triptofano, os derivados da quinurenina, são determinantes para as ações locais da IDO.

A IDO é uma enzima envolvida no catabolismo do aminoácido triptofano e tem sido implicada em processos de imunomodulação desde que foi descrita na placenta protegendo o tecido embrionário contra o sistema imune materno.¹⁰ É expressa em células apresentadoras de antígenos como as células dendríticas, macrófagos e monócitos de diversos tecidos como cólon, endométrio, pulmões e tecido gastrointestinal, sendo que o estímulo para sua expressão se dá principalmente após processo inflamatório com liberação da citocinas como INF-gama.¹⁰

Na área da oncologia, a IDO tem ganhado destaque. O processo de imunorregulação pela IDO que favorece o escape imune e crescimento tumoral parece ocorrer através de dois principais mecanismos. O primeiro seria através da depleção do triptofano no microambiente tumoral. Este aminoácido é essencial para a proliferação de algumas células do sistema imune como, por exemplo, os linfócitos T, que são sensíveis aos níveis tissulares do triptofano.¹¹ Experimentos *in vitro* mostraram que baixos níveis de triptofano bloqueiam a proliferação de linfócitos na fase G1 do ciclo celular, impossibilitando sua expansão clonal.^{11,12} Desta forma, as células que não conseguem proliferar e acabam sofrendo apoptose. O segundo mecanismo responsável pela imunorregulação pela IDO seria o acúmulo de metabólitos tóxicos derivados da degradação do triptofano, reconhecidos como derivados da quinurenina. A clivagem de triptofano promove acúmulo de metabólitos como o ácido 3- hidroxiantranílico, quinunenato e quinolinato, que em altas doses (>100µM) causam inibição da proliferação de linfócitos e também podem levar a apoptose ou morte celular.^{11,12}

Em termos de mecanismos, com a queda do aminoácido triptofano, há sensibilização da via GCN2 (do inglês *General Control Non-Derepressible 2*) por RNAt descarregado de triptofano, ativando vias de sinalização que controlam a síntese protéica, o ciclo celular, apoptose e diferenciação celular.¹³ Além disso, o triptofano é essencial para a manutenção da via do mTOR (do inglês *mammalian target of rapamycin kinase*), onde sua depleção via IDO leva à diminuição da sinalização desta via, interferindo na resposta imune.¹⁴ Com relação aos derivados das quinureninas, um dos mecanismos está relacionado à ativação do receptor de hidrocarboneto de arila, o qual influencia a expressão gênica da

célula. Por conta deste receptor ser um dos focos do estudo, será discutido com maiores detalhes mais adiante.

1.3 IDO no câncer

Estudos têm demonstrado que alguns tipos de câncer expressam o gene *IDO*, apontando a enzima como um fator protetor ao câncer por garantir um “escape imunológico”, ou seja, aquisição de tolerância imunológica ao tecido neoplásico.^{12,15}

Com base em estudos clínicos, a expressão de *IDO* “*in situ*” correlaciona-se com progressão de câncer endometrial, funcionando como marcador para pior prognóstico clínico.¹⁶ Na mesma linha de estudo, a expressão de *IDO* correlaciona-se com diminuição da sobrevida e pior prognóstico para portadores de câncer ovariano.¹⁷ Além disso, a expressão de *IDO* está presente também em câncer coloretal e está relacionada à metástase hepática com diminuição de linfócitos T.¹⁸ Embora efeito semelhante tenha sido descrito em carcinoma hepatocelular,¹⁹ estudo com cocultura de células mononucleares de sangue periférico e células de carcinoma hepatocelular demonstrou que a *IDO* é importante para a atividade imune anticâncer.²⁰ 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 pacientes.²¹

Com relação ao sistema genitourinário masculino, estudo envolvendo pacientes com câncer de próstata e com hiperplasia 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 neoplasia.²²

Não está claro o papel da *IDO* no câncer, mas sua expressão diferencial tem despertado o interesse da comunidade científica tanto no contexto de diagnóstico/prognóstico, como terapêutico. A *IDO* tem sido considerada um alvo interessante na terapia contra o câncer, fazendo com que muitos estudos clínicos fossem iniciados.²³ Há atualmente 4 estratégias em uso clínico para o bloqueio da *IDO* em câncer. O INCB 024360, o indoximod (1-metil-D-triptofano) e o NLG919, que são inibidores químicos da *IDO*, e a vacina anti-*IDO*, na qual uma pequena sequência peptídica da *IDO* é administrada no paciente, a fim de que anticorpos anti-*IDO* neutralizem a molécula.²⁴

1.4 *IDO* no câncer de bexiga

Embora a expressão da *IDO* tenha sido bem descrita em diversos tipos de câncer, pouco se sabe com relação à sua expressão e participação no câncer de bexiga.

Desperta a atenção o fato de que antes mesmo da *IDO* ser relacionada a neoplasias, seus mecanismos de regulação gênica eram estudados em cultura de células T24 de carcinoma de bexiga na década de 80.²⁵⁻²⁸ e apenas entre as primeiras décadas do século vigente um interesse maior tenha surgido quanto ao papel da enzima na patogênese do câncer de bexiga.

Um dos primeiros estudos que demonstraram a expressão de *IDO* em câncer de bexiga foi o de Uyttenhove e colaboradores. Estes pesquisadores

analisaram a expressão de IDO por imunohistoquímica em biópsias de 25 diferentes tumores humanos, demonstrando positividade em oito de dez tumores de bexiga analisados, porém apenas três apresentando positividade em mais que 50% das células tumorais.²⁹ Nesse estudo, não haviam especificado o tipo de câncer de bexiga analisado. No mesmo estudo, demonstraram que diferentes linhagens de células tumorais expressam *IDO*, porém com diferentes intensidades.²⁹ Essa foi a primeira evidência da expressão de *IDO* em tumor de bexiga e já demonstrava uma variação importante entre tumores, inclusive da mesma origem.

Até que o próximo estudo com biópsias humanas fosse publicado, o grupo chinês liderado pelo Prof. Lai, trabalhando com modelo murino ectópico de câncer de bexiga, investiu na associação da inibição da IDO com inibidores de outras enzimas. Yang e colaboradores demonstraram que o tratamento com o inibidor da IDO 1-metil-L-triptofano diminuiu o crescimento de tumor de bexiga quando associado ao inibidor da nicotinamida fosforibosil transferase, diminuindo a formação de vasos tumorais e aumentando o infiltrado de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.³⁰ O mesmo grupo usou inibição da IDO via siRNA e o efeito antitumoral foi também observado,³¹ o qual foi acentuado quando associado ao inibidor da desacetilase de histona.³²

Apenas em 2015 um estudo com biópsias de câncer de bexiga humano mais detalhado foi publicado. Nesse estudo, Yang e colaboradores estudaram 84 amostras de câncer de bexiga, sendo 30 casos classificados como Ta na escala TNM, 20 amostras como T1, 20 amostras como T2 e 14 amostras como T3/T4. Para comparação com tecido vesical normal, 22 amostras eram de doadores

saudáveis. Por meio de imunohistoquímica, detectaram a IDO em 57,1% dos casos de câncer de bexiga e em 18,2% dos casos normais. Além de estar mais presente nos casos de câncer de bexiga, a marcação imunohistoquímica é mais freqüente em casos de tumor invasivo e correlaciona-se com maior grau de anaplasia. Além de imunohistoquímica, a expressão de *IDO* foi analisada por PCR em tempo real. A expressão de IDO foi maior em graus histológicos mais avançados e em tumores mais invasivos, corroborando os dados de imunohistoquímica. Finalmente, demonstraram que a expressão de *IDO* correlaciona-se com menor tempo livre da doença.³³

Hudolin e colaboradores publicaram em 2017 uma análise envolvendo 74 espécimes de câncer de bexiga não músculo invasivo e 21 espécimes de tecido vesical normal. Avaliaram a expressão de *IDO* por meio de PCR em tempo real. A expressão de IDO foi detectada em 48 dos 78 casos de câncer de bexiga não-músculo invasivo e em 5 dos 21 casos controle. Quando os pesquisadores compararam por grau histológico e estágio tumoral, verificaram que a expressão de *IDO* foi mais frequente em tumores de alto grau histológico (76% dos casos versus 54% no baixo grau) e nos casos T1 (73% versus 48% em Ta). Contudo, não encontraram relação consistente com a sobrevida dos pacientes.³⁴

1.5 IDO e receptor de hidrocarboneto de arila (AHR)

O receptor de hidrocarboneto de arila (AHR, do inglês *aryl hydrocarbon receptor*) é um fator de transcrição que transloca-se para o núcleo celular quando é ligado à ligantes xenobióticos. A relação entre *IDO* e AHR ocorre também via L-quinurenina e seus derivados. A *IDO* catalisa a transformação de L-triptofano em

N-formil-quinurenina que, pela ação da enzima formidase, é transformada em L-quinurenina e outros catabólitos. A L-quinurenina liga-se ao AHR, induzindo a expressão de genes que controlam o sistema imune. 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 e este é um dos mecanismos para a imunossupressão anti-tumoral.³⁵ Não só a L-quinurenina, mas também seus derivados podem acionar o AHR, como exemplo o ácido quinurênico, promovendo aumento de IL-6 via AHR como um mecanismo anti-inflamatório.³⁶ Além da *IDO* promover o acionamento do AHR via quinureninas, o acionamento do receptor AHR pelo ligante 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induz a expressão de *IDO* em células dendríticas.³⁷ 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 colaboradores 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 *IDO*.³⁸

Pelo fato do AHR ser apontado como um mediador da sobrevivência e motilidade de células de glioblastoma,^{35,39} 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.⁴⁰ Além disso, a invasividade de células de carcinoma renal é controlada pelo AHR.⁴¹ Camundongos transgênicos para ativação permanente de AHR desenvolvem tumor de estômago espontaneamente.⁴² Desta maneira, a *IDO*

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, mas há evidência da participação do AHR na sua patogênese. Baker e colaboradores demonstraram a participação do AHR na diferenciação urotelial.⁴³

1.6 Racional do estudo

A enzima IDO tem participação em fenômenos fisiológicos e seu principal indutor é o INF- γ . Em particular, controla a resposta imune localmente, a tal ponto de proteger o tecido embrionário contra o ataque imune materno uma vez que é expressa em placenta. Diversos tipos de câncer expressam *IDO* e este fato coloca a enzima como uma molécula possivelmente pró-tumoral, especialmente por poder promover escape tumoral por indução de tolerância imunológica. Contudo, os poucos estudos com IDO em câncer de bexiga demonstram que sua expressão parece ser variável. É possível que as contínuas mutações decorrentes da falta de reparo das células neoplásicas favoreçam ou não a expressão de *IDO*, fazendo com que a célula adquira comportamentos diferentes. À medida que as células passam a produzir IDO, vias específicas são acionadas pelas quinureninas e uma delas é a ativação do AHR, um receptor envolvido na carcinogênese e na tumorigênese de diversos cânceres, inclusive de bexiga. Contudo, o AHR pode sofrer regulação independente das quinureninas. Um forte marcador de sua ativação é a indução da expressão do citocromo P450 do tipo 1A1 (*CYP1A1*).^{44,45}

Por conta desse racional exposto acima, a comunidade científica tem proposto terapêuticas a base da inibição química da IDO para tratamento de câncer. O grande problema é que o principal inibidor químico da IDO, o 1-metil-D-triptofano, liga-se ao AHR, exercendo o papel das quinureninas.⁴⁶ Desta maneira, é de fundamental importância sabermos se a IDO é diferencialmente expressa em câncer de bexiga, elegendo todos os pacientes à terapia com 1-metil-D-triptofano, ou se há diferenciação na expressão de *IDO*, bem como em genes relacionados à ativação do AHR, abrindo a necessidade de diagnóstico mais preciso para o estabelecimento de protocolos terapêuticos personalizados.

2 OBJETIVO

Verificar se a *IDO* é diferencialmente expressa em câncer de bexiga quando comparado ao tecido vesical normal e se há diferença de sua expressão entre CBNMI e CBMI, utilizando-se bancos de dados de *microarray* publicados na plataforma GEO Datasets,

Secundariamente, verificar se há correlação entre a expressão de *IDO* e *INF- γ* (principal indutor da *IDO*), *AHR* e *CYP1A1* (indicador de ativação do AHR).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o presente estudo, foi realizada uma pesquisa de banco de dados (séries) depositados no GEO Datasets (*Gene Expression Omnibus*) da plataforma NCBI (*National Center of Biotechnology Information*). Para tanto, foi usado o descritor “bladder cancer” e utilizado o filtro para *microarray*. Assim, apenas bancos de dados oriundos de análise por *microarray* foram utilizados, embora existam bancos de RNAseq (sequenciamento de nova geração). A escolha pelo *microarray* se deu por conta do NCBI oferecer um aplicativo para análise estatística que permite apenas corridas realizadas em *microarrays*. Este aplicativo é reconhecido como GEO2R. O GEO2R faz a interface entre o banco de dados depositado pelo pesquisador e o programa de estatística R enriquecido com a ferramenta de produtividade RStudio. O pacote estatístico adotado pelo GEO2R é o limma R (do inglês *Linear Models for Microarray Analysis*) (Version info: R 3.2.3, Biobase 2.30.0, GEOquery 2.40.0, limma 3.26.8).⁴⁷

Cada banco de dados é reconhecido como uma série e recebe a identificação GSE. Já a plataforma de *microarray* recebe a identificação GPL.

3.1 Da seleção dos bancos

3.1a Validação com banco de tecidos normais

O primeiro passo foi a seleção de um banco de dados que oferecesse a expressão de IDO em diversos tecidos humanos normais. Precisávamos de uma série com informação de diversos tecidos, a fim de construirmos uma análise entre dois grupos: um grupo com baixa expressão de IDO e outro com alta

expressão da IDO. A partir desses dois grupos, teríamos condições de verificar se a expressão de INF-gama, AHR e CYP1A1 tem correlação com a expressão de IDO. Desta maneira, foi analisada a série GSE14938 que ofereceu dados de 42 tecidos humanos, sendo 13 com elevada expressão de IDO e 29 com baixa expressão. A Figura 1 demonstra a expressão de IDO nos diferentes tecidos.

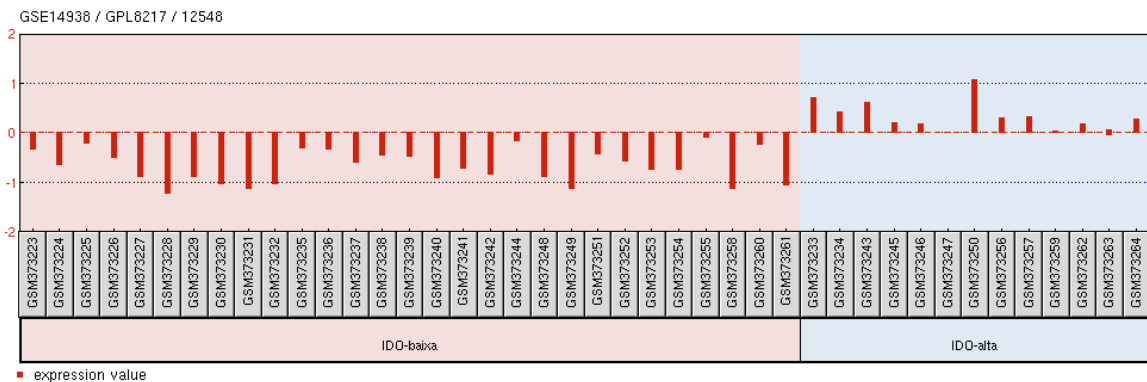


Figura 1: Gráfico extraído do GEO Datasets demonstrando a expressão da IDO na série GSE14938. Dos 42 tecidos humanos normais, 13 apresentaram elevada expressão de IDO, sendo a placenta o tecido com maior expressão da enzima. Os tecidos com alta expressão de IDO, em ordem progressiva de expressão, foram: tireóide, músculo esquelético, baço, mama, timo, linfonodo, traquéia, íleo, jejuno, células T CD8⁺, pulmão, células CD4⁺ e placenta.

3.1b Análise de tecido vesical normal versus câncer de bexiga

Foram selecionados bancos que oferecessem amostras de tecido vesical normal (identificadas ao longo da dissertação como indivíduos normais, sem câncer de bexiga) e amostras de câncer de bexiga, sendo no mínimo três amostras de cada condição.

Até março de 2018, a GEO DataSets do NCBI ofereceu 3110 estudos sobre expressão gênica rastreados com o descritor “bladder cancer”. Destes, 123 foram estudos com *microarray*. Após análise dos 123, doze séries foram selecionadas. O critério para a seleção foi estabelecido da seguinte forma: os estudos deveriam ser baseados em espécimes de bexiga e as séries deveriam oferecer tecido vesical normal e tecido de tumor de bexiga ou apenas tumor de bexiga desde que houvesse classificação em CBNMI e CBMI. Das doze séries selecionadas, oito séries ofereceram dados de amostras de bexiga normal e de tumor vesical e oito ofereceram apenas amostras de tumor vesical. O fluxograma do processo de seleção está ilustrado na Figura 2. As séries e suas respectivas plataformas são apresentadas na Tabela 2.

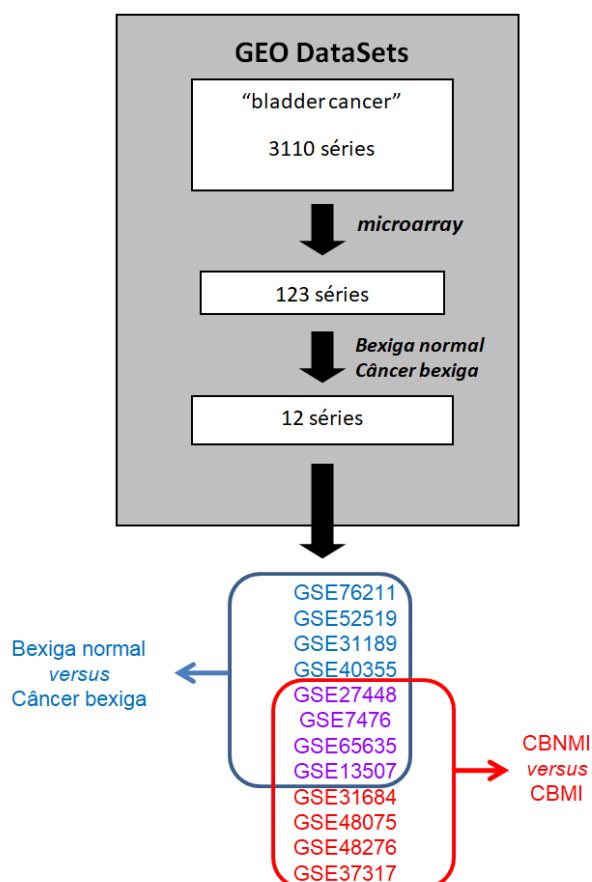


Figura 2: Fluxograma do processo de seleção das séries da plataforma GeoDatasets. Das doze séries selecionadas, 8 ofereceram análise entre bexiga normal e câncer de bexiga e 8 ofereceram análise entre CBNMI e CBMI.

Tabela 2: Bancos de dados de *microarray* selecionados do NCBI/GEO DataSets que fornecem dados de expressão gênica de tecido vesical normal e câncer de bexiga. Além do número de série, a tabela apresenta as plataformas utilizadas em cada estudo.

	Série	Plataforma
1	GSE76211	GPL17586 - Affymetrix Human Transcriptome Array 2.0 [HTA-2_0]
2	GSE52519	GPL6884 - Illumina HumanWG-6 v3.0 expression beadchip
3	GSE31189	GPL570 - Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array [HG-U133_Plus_2]
4	GSE27448	GPL2895 - GE Healthcare/Amersham Biosciences Whole Genome Bioarray
5	GSE40355	GPL13497 - Agilent-026652 Whole Human Genome Microarray 4x44K v2
6	GSE7476	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
7	GSE65635	GPL14951 - Illumina HumanHT-12 WG-DASL V4.0 R2 expression beadchip
8	GSE13507	GPL6102 - Illumina human-6 v2.0 expression beadchip
9	GSE31684	GPL570 - Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array [HG-U133_Plus_2]
10	GSE48075	GPL6947 - Illumina HumanHT-12 V3.0 expression beadchip
11	GSE48276	GPL14951 - Illumina HumanHT-12 WG-DASL V4.0 R2 expression beadchip
12	GSE37317	GPL96 - [HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array

Vale salientar que as análises das séries foram feitas individualmente, ou seja, sem fusão de dados de series diferentes, pois cada estudo utilizou uma plataforma de microarray diferente, kits diferentes para extração de RNA e confecção de cDNA e sob condições laboratoriais diferentes.

3.1c Análise da sobrevida dos pacientes

A série GSE13507 ofereceu dados de sobrevida dos pacientes. Desta maneira, foi possível analisar a correlação entre a expressão de IDO e a sobrevida dos pacientes, bem como realizar a análise de Kaplan Meier da sobrevida a partir de dois grupos: expressão elevada de IDO e expressão suprimida de IDO.

3.2 Análise estatística

O aplicativo GEO2R utiliza o teste de Benjamini & Hochberg para a análise estatística intergrupos.^{47,48} O aplicativo trabalha com transformação log quando necessário. Foi considerado gene diferencialmente expresso o que apresentasse valor de P ajustado menor do que 0,05.

Para análise de correlação, os valores de expressão de cada série foram extraídos e a análise foi realizada fora da plataforma GeoDataSets. Estes valores correspondem à leitura ajustada realizada por cada plataforma de *microarray*. Foi verificada a normalidade a partir dos testes Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, utilizando-se o programa SPSS versão 22, e aplicado o teste de Person para dados com distribuição normal e Spearman para dados sem distribuição normal. A regressão linear também foi aplicada utilizando-se o programa SPSS versão 22. A análise de sobrevida e representação gráfica Kaplan Meier também foram realizados pelo programa SPSS.

4 RESULTADOS

4.1 Correlação entre *IDO*, *INF-gama*, *AHR* e *CYP1A1* em tecidos humanos normais

O primeiro passo foi verificar se há correlação entre a expressão de *IDO* com a expressão dos genes *INF-gama*, *AHR* e *CYP1A1* em tecidos humanos normais. Conforme demonstrado na Tabela 3, a expressão de *IDO* correlacionou-se positivamente com a expressão de *INF-gama*, *AHR* e *CYP1A1*.

Tabela 3. Correlação entre expressão de *IDO*, *INF-gama*, *AHR* e *CYP1A1* em tecido vesical normal.

	<i>IDO</i>	<i>INF-gama</i>	<i>AHR</i>	<i>CYP1A1</i>
<i>IDO</i> (coeficiente)	1,000	0,595**	0,729**	0,327*
<i>INF-gama</i> (coeficiente)	0,595**	1,000	0,523**	0,454**
<i>AHR</i> (coeficiente)	0,729**	0,523**	1,000	0,114
<i>CYP1A1</i> (coeficiente)	0,327*	0,454**	0,114	1,000

* p<0,05 e ** P<0,001

A análise de regressão linear demonstrou causalidade entre *INF-gama* e *IDO* (p<0,001) e entre *IDO* e *AHR* (p<0,001), porém não houve significância entre *IDO* e *CYP1A1*. A Figura 3 demonstra os gráficos de dispersão, mostrando a correlação positiva entre a expressão dos genes estudados.

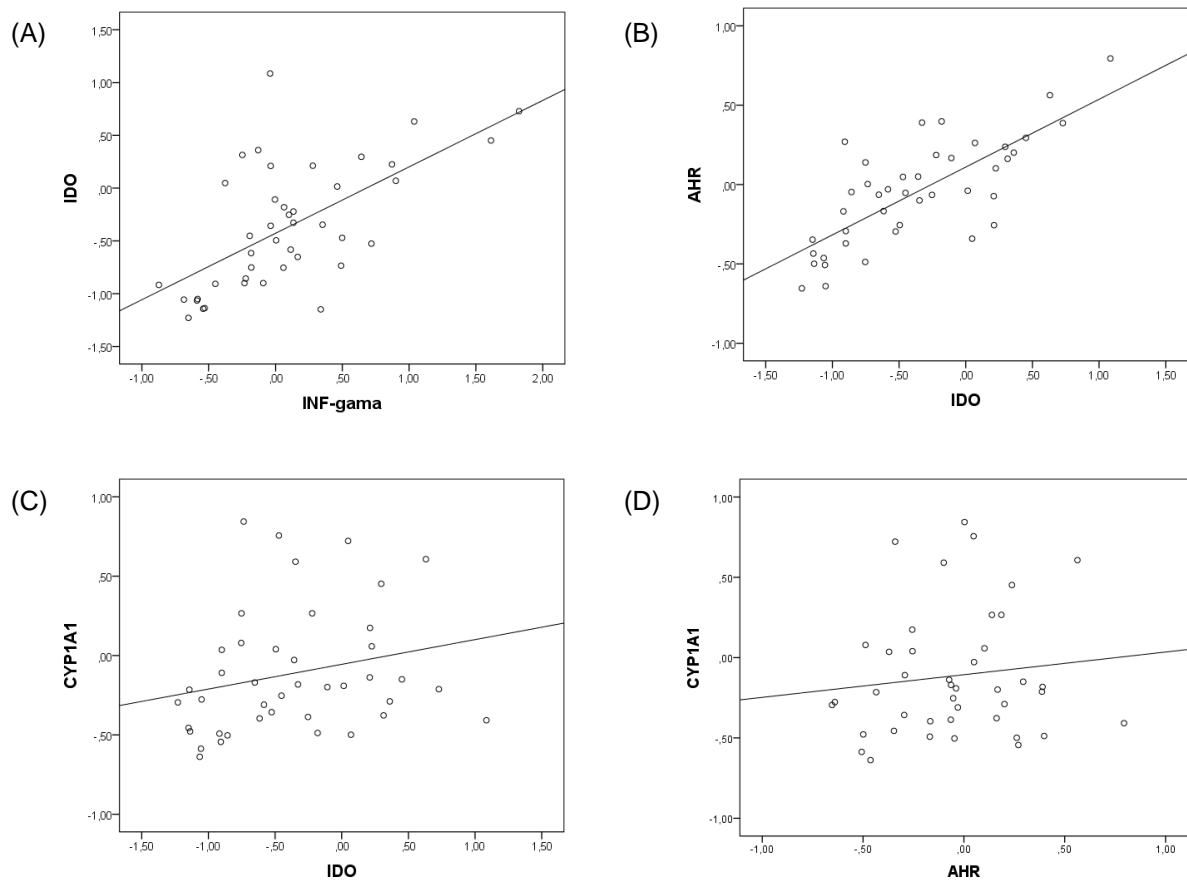


Figura 3: Gráficos de dispersão para ilustrar a correlação entre a expressão dos genes *IDO* e *INF-gama* (A), *AHR* e *IDO* (B), *CYP1A1* e *IDO* (C) e *CYP1A1* e *AHR* (D).

4.2 Comparação da expressão de *IDO*, *INF-gama*, *AHR* e *CYP1A1* entre tecido vesical normal e câncer de bexiga

A análise de expressão por meio do Geo2R demonstrou que das oito séries que ofereceram comparação entre tecido vesical normal e câncer de bexiga, nenhuma apresentou diferença na expressão de *IDO*, *INF-gama* e *CYP1A1* (Tabela 4). Já com relação à expressão de *AHR*, em apenas uma série houve aumento de *AHR* em câncer de bexiga (Tabela 4).

Tabela 4: Análise da expressão de *IDO*, *INF-gama*, *AHR* e *CYP1A1* entre tecido vesical normal e câncer de bexiga. O LogFC positivo indica maior expressão no câncer de bexiga e o LogFC negativo indica menor expressão no câncer de bexiga. P<0,05 foi adotado como significativo.

Séries			<i>IDO</i>		<i>INF-γ</i>		<i>AHR</i>		<i>CYP1A1</i>	
	Grupo	n	LogFC	Valor P	LogFC	Valor P	LogFC	Valor P	LogFC	Valor P
GSE76211	Normal	3								
	Câncer Bexiga	3	0,111	1,000	0,019	1,000	0,108	1,000	0,039	1,000
GSE52519	Normal	3								
	Câncer Bexiga	8	0,885	0,558	0,069	0,939	0,535	0,776	-286	0,537
GSE31189	Normal	40								
	Câncer Bexiga	52	0,277	1,000	-0,381	1,000	-0,046	1,000	-0,237	1,000
GSE27448	Normal	5								
	Câncer Bexiga	10	0,065	0,891	-0,106	0,712	2,720	0,485	-0,633	0,780
GSE40355	Normal	8								
	Câncer Bexiga	16	-0,308	0,817	-1,140	0,309	0,294	0,725	-0,408	0,899
GSE7476	Normal	3								
	Câncer Bexiga	9	0,622	0,367	0,036	0,849	0,143	0,811	1,119	0,536
GSE65635	Normal	4								
	Câncer Bexiga	8	0,497	0,061	0,059	0,699	10,286	0,006	-0,841	0,077
GSE13507	Normal	10								
	Câncer Bexiga	165	-0,280	0,445	-0,127	0,308	0,135	0,413	0,308	0,748

4.3 Comparação da expressão de *IDO*, *INF-gama*, *AHR* e *CYP1A1* entre tecido vesical normal e CBNMI

Das cinco séries que ofereceram comparação entre tecido vesical normal e CBNMI, nenhuma apresentou diferença na expressão de *IDO*, *INF-gama* e *CYP1A1* (Tabela 5). Já com relação à expressão de *AHR*, em apenas uma série houve aumento de *AHR* em CBNMI (Tabela 5).

Tabela 5: Análise da expressão de *IDO*, *INF-gama*, *AHR* e *CYP1A1* entre tecido vesical normal e CBNMI. O LogFC positivo indica maior expressão no câncer de bexiga e o LogFC negativo indica menor expressão no câncer de bexiga. P<0,05 foi adotado como significativo.

			<i>IDO</i>		<i>INF-γ</i>		<i>AHR</i>		<i>CYP1A1</i>	
	<i>Grupo</i>	<i>n</i>	<i>LogFC</i>	<i>Valor P</i>	<i>LogFC</i>	<i>Valor P</i>	<i>LogFC</i>	<i>Valor P</i>	<i>LogFC</i>	<i>Valor P</i>
GSE27448	Normal	5	0,139	0,797	-0,147	0,652	22.367	0,571	-12.450	0,552
	CBNMI	6								
GSE40355	Normal	8	-0,565	0,621	-11,923	0,248	-0,320	0,8120	-1,269	0,515
	CBNMI	12								
GSE7476	Normal	3	0,260	0,477	0,030	0,904	-0,007	0,987	0,345	0,839
	CBNMI	6								
GSE65635	Normal	4	0,474	0,054	0,055	0,748	117,138	0,004	-0,862	0,158
	CBNMI	5								
GSE13507	Normal	10	-0,410	0,1740	-0,142	0,1890	-0,164	0,323	0,0446	0,9510
	CBNMI	104								

4.4 Comparação da expressão de *IDO*, *INF-gama*, *AHR* e *CYP1A1* entre tecido vesical normal e CBMI

Das cinco séries que ofereceram comparação entre tecido vesical normal e CBMI, nenhuma apresentou diferença na expressão de *IDO*, *INF-gama*, *AHR* e *CYP1A1* (Tabela 6).

Tabela 6: Análise da expressão de *IDO*, *INF-gama*, *AHR* e *CYP1A1* entre tecido vesical normal e CBNMI. O LogFC positivo indica maior expressão no câncer de bexiga e o LogFC negativo indica menor expressão no câncer de bexiga. P<0,05 foi adotado como significativo.

	<i>Grupo</i>	<i>n</i>	<i>IDO</i>		<i>INF-γ</i>		<i>AHR</i>		<i>CYP1A1</i>	
			<i>LogFC</i>	<i>Valor P</i>	<i>LogFC</i>	<i>Valor P</i>	<i>LogFC</i>	<i>Valor P</i>	<i>LogFC</i>	<i>Valor P</i>
GSE52519	Normal	3	0,885	0,558	0,069	0,939	0,535	0,776	-286,95	0,537
	CBMI	8								
GSE27448	Normal	5	-0,045	0,957	-0,045	0,954	34.457.366	0,836	0,286	0,960
	CBMI	4								
GSE7476	Normal	3	1,350	0,089	0,047	0,853	0,443	0,566	2,670	0,116
	CBMI	3								
GSE65635	Normal	4	0,535	0,156	0,082	0,712	0,791	0,051	-0,806	0,365
	CBMI	3								
GSE13507	Normal	10	-0,078	0,875	-0,103	0,532	0,085	0,599	0,781	0,504
	CBMI	61								

4.5 Comparação da expressão de *IDO*, *INF-gama*, *AHR* e *CYP1A1* entre CBNMI e CBMI

Das oito séries que permitiram a análise entre CBNMI e CBMI, apenas duas séries demonstraram aumento da expressão de *IDO* no CBMI (GSE13507 e GSE48075, Tabela 7), sendo que uma delas (GSE13507) apresentou aumento da expressão de *CYP1A1* (Tabela 7). Não foram detectadas diferenças na expressão dos outros genes analisados.

Tabela 7. Análise da expressão de *IDO*, *INF-gama*, *AHR* e *CYP1A1* entre CBMNI e CBMI. O LogFC positivo indica maior expressão no CBMI e o LogFC negativo indica menor expressão no CBMI. P<0,05 foi adotado como significativo.

	<i>Grupo</i>	<i>n</i>	<i>IDO</i>		<i>INF-γ</i>		<i>AHR</i>		<i>CYP1A1</i>	
			<i>LogFC</i>	<i>Valor P</i>	<i>LogFC</i>	<i>Valor P</i>	<i>LogFC</i>	<i>Valor P</i>	<i>LogFC</i>	<i>Valor P</i>
GSE27448	CBNMI	6	-0,184	0,927	0,102	0,9190	1,210	0,952	1,53	0,908
	CBMI	4								
GSE7476	CBNMI	6	1,085	0,455	0,0170	0,979	0,450	0,801	232,414	0,589
	CBMI	3								
GSE65635	CBNMI	5	0,061	0,993	0,036	0,988	-0,381	0,980	0,056	0,985
	CBMI	3								
GSE13507	CBNMI	104	0,396	0,005	0,053	0,433	0,069	0,423	0,698	0,043
	CBMI	61								
GSE31684	CBNMI	27	1,320	0,387	0,513	0,605	-0,486	0,686	0,068	1,000
	CBMI	66								
GSE48075	CBNMI	69	0,661	0,005	0,253	0,098	-0,237	0,225	-0,062	0,917
	CBMI	73								
GSE48276	CBNMI	12	0,415	0,861	0,522	0,701	-0,205	0,759	-0,625	0,553
	CBMI	104								
GSE37317	CBNMI	8	0,356	0,799	0,101	0,845	-0,023	0,992	117.926	0,848
	CBMI	11								

4.6 Análise de correlação entre a expressão de *IDO* e *INF-gama*, *AHR* e *CYP1A1*

Conforme apresentado na Tabela 8, das doze séries analisadas no total, seis apresentaram correlação positiva entre a expressão de *IDO* e a expressão de *INF-gama*. A expressão de *IDO* teve correlação positiva com a expressão de *AHR* em apenas uma série e correlação negativa em três séries. A expressão de *IDO* correlacionou-se positivamente com *CYP1A1* em duas séries e negativamente em três séries (Tabela 8).

Tabela 8. Análise de correlação entre *IDO* e *INF-gama*, *AHR* e *CYP1A1*. Apenas os valores das correlações significativas aparecem na tabela. Os coeficientes e valores de P das comparações não significativas foram omitidos, sendo substituídos pelo hífen (-).

Séries	<i>IDO versus:</i>		<i>INF-γ</i>	<i>AHR</i>	<i>CYP1A1</i>
	Grupo	<i>n</i>	Coeficiente (<i>p</i>)	Coeficiente (<i>p</i>)	Coeficiente (<i>p</i>)
GSE76211	Normal	3	-	-	-
	Câncer bexiga	3	-	-	-
GSE52519	Normal	3	-	-	-0,645 (0,032)
	Câncer bexiga	8	-	-	-
GSE31189	Normal	40	-	-	-
	Câncer bexiga	52	-	-	-
GSE27448	Normal	5	-	-	-
	Câncer bexiga	10	-	-	-
GSE40355	Normal	8	0,654 (0,001)	-	0,539 (0,007)
	Câncer bexiga	16	-	-	-
GSE7476	Normal	3	-	-	0,696 (0,012)
	Câncer bexiga	9	-	-	-
GSE65635	Normal	4	-	0,692 (0,013)	-0,790 (0,002)
	Câncer bexiga	8	-	-	-
GSE13507	Normal	10	0,306 (0,001)	-	-
	Câncer bexiga	165	-	-	-
GSE31684	CBNMI	27	0,548 (0,001)	-0,284 (0,006)	-0,212 (0,041)
	CBMI	66	-	-	-
GSE48075	CBNMI	69	0,228 (0,006)	-	-
	CBMI	73	-	-	-
GSE48276	CBNMI	12	0,495 (0,001)	-0,407 (0,001)	-
	CBMI	104	-	-	-
GSE37317	CBNMI	8	0,639 (0,004)	-0,521 (0,027)	-
	CBMI	11	-	-	-

4.7 Análise de correlação da série GSE13507

Por conta da série GSE13507 oferecer os dados de sobrevida dos pacientes, foi feita a análise de correlação entre a expressão de *IDO* e a sobrevida. Houve uma correlação negativa entre a sobrevida e a expressão de *IDO* (coeficiente de -0,269, $p < 0,0001$). Ao confrontarmos a sobrevida com a expressão de *IDO* por meio de regressão linear, observamos uma relação causal entre a expressão de *IDO* e a sobrevida dos pacientes, tanto para pacientes com CBNMI como pacientes com CBMI (exceto estágio T4) (Figura 4).

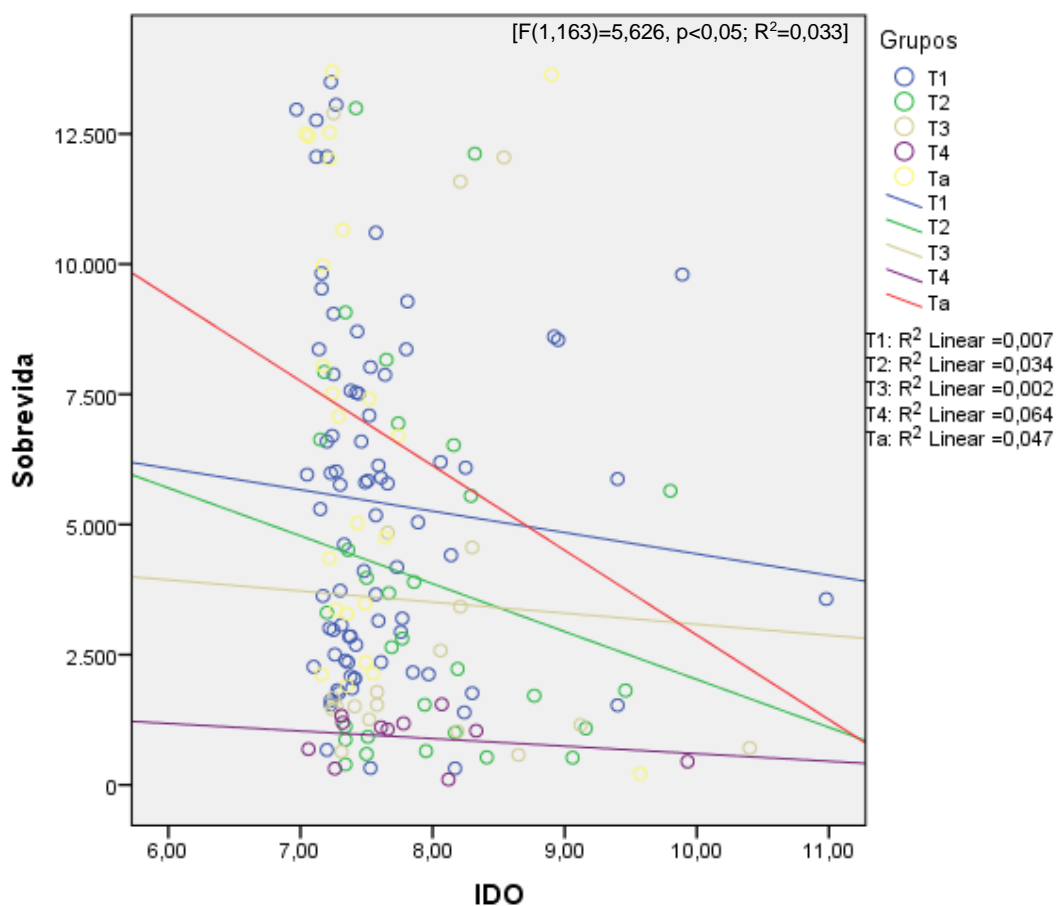


Figura 4: Gráfico de dispersão demonstrando a relação entre expressão de *IDO* e a sobrevida dos pacientes.

Contudo, quando separamos em dois grupos usando um corte para a expressão de *IDO*, determinando um grupo com baixa expressão e um grupo com alta expressão, a curva de Kaplan Meier demonstra uma maior sobrevida no grupo de pacientes com baixa expressão, porém não houve diferença significativa (Figura 5).

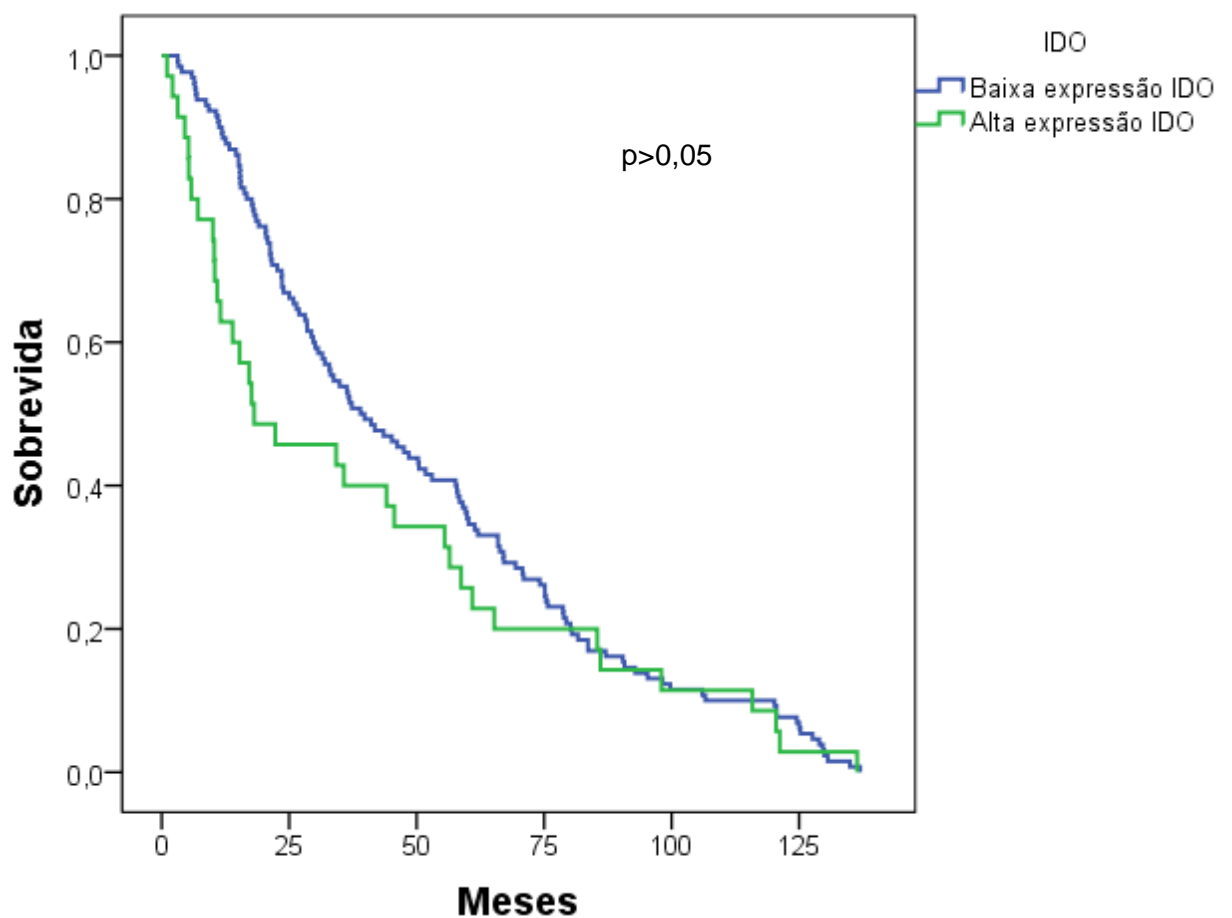


Figura 5. Curva de Kaplan Meier demonstrando a sobrevida dos pacientes com baixa expressão de *IDO* e alta expressão de *IDO*. O corte para a determinação dos grupos foi feito pelo terceiro quartil.

5 DISCUSSÃO

A oncologia tem avançado exponencialmente nos últimos anos e atualmente tem investido vigorosamente em protocolos à base de imunoterapia. Este panorama coloca a enzima IDO como uma forte candidata a alvo terapêutico por conta de seu papel imunomodulador. Sua expressão tumoral, seja por células inflamatórias do estroma ou pelas próprias células neoplásicas, favorece a tolerância imunológica e consequentemente o escape tumoral. Neste contexto, a comunidade científica tem investido na elaboração de protocolos com inibidores químicos da IDO, dentre eles o 1-metil-D-triptofano, o qual apresenta-se para a população submetida a ensaios clínicos iniciais como indoximod.⁴⁹ Outros inibidores têm sido desenvolvidos, apresentando cada vez mais eficácia na inibição da IDO.⁴⁹

Os estudos com espécimes de câncer têm demonstrado que a expressão de *IDO* é variada entre os tumores. Há tumores positivos para *IDO* em células neoplásicas, outros são positivos para *IDO* em células do estroma, outros são positivos para ambas e outros são totalmente negativos para *IDO*. Por conta desse cenário, os inibidores da *IDO* podem apresentar eficácia limitada em alguns pacientes oncológicos. Ademais, alguns desses inibidores podem agir como agonistas ao ligarem-se à AHR. A caracterização de cada tumor quanto à expressão da *IDO* e do *AHR* é relevante pois pode gerar propostas de terapêuticas personalizadas.

Tratando-se de câncer de bexiga, há muito pouco estudo analisando a expressão de *IDO* em espécimes humanas. Os dois estudos mais detalhados demonstram variação na expressão de *IDO*.

A proposta do presente estudo foi utilizar bancos de dados de *microarray* para a análise da expressão de *IDO* e genes relacionados ao *AHR* em câncer de bexiga. O avanço de métodos de biologia molecular tem permitido uma análise transcriptômica mais abrangente e minuciosa. A possibilidade de acesso às análises realizadas por outros pesquisadores é fundamental para o desenvolvimento científico. Neste cenário, além da NCBI permitir esse acesso, há intenção de facilitar a análise com o desenvolvimento de aplicativos como o Geo2R. Trabalhando com essa proposta, foi possível rastrear 3.110 estudos depositados e destes 12 foram selecionados por permitirem as comparações propostas.

Na primeira fase, propusemos validar nossa análise demonstrando a relação entre *IDO* e seu principal indutor, o *INF- γ* , e entre *IDO* e o *AHR* e *CYP1A1* em tecidos humanos normais. Nossos resultados demonstram que a expressão de *IDO* tem correlação positiva com a expressão de *INF- γ* , *AHR* e *CYP1A1*, tratando-se de tecido normal. Nossos resultados corroboram a literatura no sentido de confirmar que tecidos como baço, timo, linfonodo, intestinos, células imunes e placenta expressam *IDO* e existe causalidade com os outros genes estudados. Assim, os tecidos com alta expressão de *IDO* possuem alta expressão de *INF- γ* , *AHR* e *CYP1A1*.

Em tecido normal, a expressão de *IDO* responde ao *INF- γ* e o *AHR* está aumentado.

Quando comparamos tecido vesical normal e câncer de bexiga, independente da classificação em CBNMI ou CBMI, não houve diferença na expressão de *IDO*, *INF- γ* e *CYP1A1* nas oito séries analisadas. Apenas uma série apresentou diferença na expressão de *AHR*, sendo maior no câncer de bexiga. Das oito séries, seis apresentaram LogFC positivos para *IDO*, demonstrando que a expressão de *IDO* é maior no câncer de bexiga, porém não foi significativa. Embora muitas séries tenham usado um número pequeno de amostras, duas delas (GSE31189 e GSE13507) apresentavam um número relevante. Mesmo assim, não encontramos diferença. Com estes resultados, percebe-se que a variabilidade da expressão dos genes avaliados em câncer de bexiga é alta.

Efeito semelhante foi encontrado ao compararmos tecido vesical normal com CBNMI e tecido vesical normal com CBMI. O LogFc foi positivo na maioria das séries, porém não houve diferença estatística.

Quando comparamos a expressão dos genes entre CBNMI e CBMI, das oito séries analisadas, houve diferença na expressão de *IDO* em duas séries, onde a expressão foi maior no CBMI, e a expressão de *CYP1A1* acompanhou a expressão de *IDO* em uma das séries, apresentando-se elevada no CBMI.

Van Baren e colaboradores realizaram uma análise transcriptômica para análise da expressão de *IDO* a partir de bancos de dados, porém compilaram os dados e construíram uma matriz única pelos programas do Bioconductor. Neste estudo, analisaram 31 tipos diferentes de câncer, incluindo o câncer de bexiga com 357 casos. Demonstraram que a expressão de *IDO* está aumentada em muitos casos de câncer de bexiga em comparação com tecido vesical normal, porém também encontraram alta variância, impossibilitando uma diferença significativa na análise das médias intergrupos.⁵⁰

O motivo da alta variação na expressão de *IDO* entre os casos de câncer de bexiga é incerto. A oscilação na expressão de *IDO* poderia ser explicada pelo status inflamatório do tumor, já que a *IDO* é expressa em células inflamatórias e poderia ser trazida para dentro do tumor pela infiltração destas células. O estudo transcriptômico não é capaz de apontar o tipo de célula produtor de *IDO*, uma vantagem oferecida pelos estudos imuno-histoquímicos. Os únicos dois estudos que realizaram imuno-histoquímica para *IDO* em câncer de bexiga apontaram a expressão de *IDO* apenas em células neoplásicas, não aprofundando para células estromais.^{33,34} Esta questão poderá ser esclarecida em estudos futuros.

A variação encontrada na expressão de *IDO* entre os casos de câncer de bexiga poderia também ser fruto da instabilidade genômica das células neoplásicas provocada pelas mutações pré-existentes e pelas

novas mutações que são geradas continuamente por conta de um desgaste no sistema de reparo. De qualquer maneira, está clara a variação existente, abrindo para a necessidade de caracterização prévia ao início de tratamento com inibidores da IDO.

Os resultados apontam para uma maior produção de IDO em tumores músculo-invasivos. Este achado corrobora os estudos de Yang e colaboradores e Hudolimn e colaboradores que demonstraram maior marcação de IDO em tumores músculo-invasivos em comparação com os tumores não-músculo invasivos.^{33,34} Este fato explicaria a menor sobrevida dos pacientes com alta expressão de IDO. Apenas uma série analisada no presente estudo possibilitou a análise de sobrevida. Encontramos correção negativa entre a expressão de IDO e a sobrevida dos pacientes, porém a análise Kaplan Meier utilizando uma nota de corte para a distinção de dois grupos - baixa expressão e alta expressão de IDO) – não mostrou diferença estatística. De qualquer maneira, é possível que a maior expressão de IDO proporcione um ambiente favorável ao desenvolvimento tumoral por conta de seus mecanismos imunomoduladores, diminuindo a sobrevida dos pacientes. Estudos com outros tipos de câncer demonstraram a relação da IDO com a sobrevida de pacientes. Ino e colaboradores demonstraram que a maior expressão de IDO em câncer de endométrio correlaciona-se com menor sobrevida.¹⁶ Semelhantemente, Takao e colaboradores demonstraram que a maior expressão de IDO correlaciona-se com pior sobrevida em câncer de ovário.¹⁷

Dados de nosso laboratório mostram que a linhagem de carcinoma de bexiga músculo-invasivo T24 expressa constitutivamente *IDO*, sendo uma expressão quinhentas vezes maior do que a expressão de *IDO* na linhagem não-músculo invasivo RT4 (dados ainda não publicados). Em experimento realizado em nosso laboratório, a inoculação de células T24 sob a cápsula renal de camundongos nude imunodeficientes permitiu que um grupo de células migrasse em direção ao parênquima renal, enquanto um grupo maior permaneceu isolado sob a cápsula. Ao identificar a *IDO* por meio de imuno-histoquímica, foi possível verificar que as células infiltrantes expressavam mais *IDO* em comparação com as células não infiltrantes, porém as células periféricas e do fronte do infiltrado apresentaram-se negativas para *IDO*.⁵¹ Estas mesmas células quando tratadas em cultura com TGF-beta, um importante indutor da transição epitélio-mesenquimal e portanto um promotor de metástase tumoral, as células T24 diminuíram significativamente a expressão de *IDO*, enquanto aumentavam a expressão dos marcadores mesenquimais.⁵¹ Trabalhando com o modelo de migração celular Matrigel/transwell, foi possível separar células T24 invasivas de células não invasivas e a expressão de *IDO* diminuiu significativamente nas células invasivas (dados serão apresentados na *Federation of American Societies for Experimental Biology - Faseb* 2018). É possível que a expressão de *IDO* esteja em um “pacote” de genes associados à agressividade tumoral e que esteja funcionando como gatilho para o

acionamento de processos específicos, tais como a transição epitélio-mesenquimal.

Os resultados do presente estudo demonstraram forte relação da *IDO* com *INF- γ* em tecido vesical normal, porém esta relação não está presente em todas as séries analisadas com câncer de bexiga. É possível que no câncer de bexiga outros fatores possam influenciar a expressão de *IDO*, além do *INF- γ* . A IL-6, por exemplo, é responsável pela sustentação da expressão de *IDO* em alguns tumores.⁵²

O mesmo encontrou-se com relação à expressão de *CYP1A1*, um marcador para a ativação do AHR. A expressão de *IDO* correlacionou-se com a expressão de *CYP1A1* em tecido vesical normal, porém esta relação foi presente em apenas cinco das doze séries analisadas com câncer de bexiga. É possível que a expressão da *IDO* esteja baixa frente a uma expressão aumentada de *CYP1A1* por conta do AHR poder ser acionado por outros fatores que independem da *IDO*.⁵³ Porém, pelos dados deste estudo, a alta expressão de *IDO* poderia ocorrer na vigência da baixa expressão de *CYP1A1*. No estudo por *microarray*, ficamos limitados à expressão pela análise do mRNA e não da proteína, ou seja, é possível que a expressão de *IDO* via mRNA esteja aumentada, porém a produção da proteína pode não corresponder por conta dos controles traducionais presentes nas células. Ou ainda, a proteína *IDO* pode estar aumentada, porém sua atividade enzimática inibida, onde a produção dos derivados de

quinurenina estariam diminuídos, ativando menos o AHR e consequentemente menor expressão de *CYP1A1*. Novos estudos são necessários para comprovar tais hipóteses.

A nova geração de protocolos terapêuticos anticâncer conta com a inclusão de imunomoduladores, colocando os inibidores da IDO e inibidores do AHR como potenciais.^{49,54} Diversos estudos clínicos com inibidores da IDO já foram iniciados.⁴⁹ Um ponto que merece destaque é a possibilidade dos inibidores, tais como o 1-metil-D-triptofano, exercerem efeitos agonistas à IDO ativando AHR. Esse efeito foi demonstrado recentemente em células dendríticas.⁴⁶ Se esse efeito ocorrer em células de carcinoma de bexiga, estaríamos potencializando o efeito da IDO via AHR. Um dos pontos mais relevantes deste estudo está no apontamento do disparate que existe no câncer de bexiga tratando-se da expressão de IDO, AHR e *CYP1A1*. A identificação do perfil tumoral pode revelar a necessidade da terapia, ou seja, indivíduo com tumor apresentando alta expressão de IDO e baixa expressão de AHR e *CYP1A1* teria forte indicação para o uso de 1-metil-D-triptofano. Já o indivíduo com tumor apresentando baixa expressão de IDO e alta expressão de AHR e *CYP1A1* teria a contraindicação para o uso de 1-metil-D-triptofano. Finalmente, o indivíduo com alta expressão de IDO, AHR e *CYP1A1* poderia ter indicação de 1-metil-D-triptofano associado a inibidor de AHR.

É possível que no futuro consigamos estabelecer terapêuticas personalizadas contando com a associação dos moduladores do eixo IDO-AHR-CYP1A1 com medicamentos clássicos.

6 CONCLUSÃO

- A expressão de *IDO* correlaciona-se positivamente com *INF- γ* , *AHR* em *CYP1A1* em tecido vesical normal, porém essa relação se perde no câncer de bexiga, indicando uma instabilidade genômica para essa via;
- A expressão de *IDO* é aumentada em CBMI, sugerindo sua participação na progressão deste tipo de câncer;
- A análise do perfil de expressão é essencial para o estabelecimento de terapêuticas com uso de inibidores da *IDO*

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. Silva, José A G. Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2016.
02. Siegel, RL; MPH, Miller, KD; Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016 Jan-Feb;66(1):7-30.
03. INCA, 2016. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.
04. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffoux C, Denis L, Newling DW, Kurth K. 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 Mar;49(3):466-5; discussion 475-7.
05. Williams SK, Hoenig DM, Ghavamian R, Soloway M. Intravesical therapy for bladder cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2010 Apr;11(6):947-58.
06. Pan J, Liu M, Zhou X. Can intravesical bacillus Calmette-Guérin reduce recurrence in patients with non-muscle invasive bladder cancer? An update and cumulative meta-analysis. *Front Med*. 2014.
07. Prescott S, Jackson AM, Hawkyard SJ, Alexandroff AB, James K. Mechanisms of action of intravesical bacille Calmette-Guérin: local immune mechanisms. *Clin Infect Dis*. 2000;31 Suppl 3.
08. 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.
09. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.

15. 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.
16. Ino K, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer. *Br J Cancer* 95,1555–1561, 2006.
17. Takao M, et al. Increased synthesis of indoleamine-2,3-dioxygenase protein is positively associated with impaired survival in patients with serous-type, but not with other types of, ovarian cancer. *Oncol Rep* 17, 1333–1339, 2007.
18. Brandacher G, et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Res* 12,1144–1151, 2006.
19. Pan K, et al. Expression and prognosis role of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*,134, 1247–1253, 2008.
20. Ishio T, et al. Immunoactivative role of indoleamine 2,3-dioxygenase in human hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol Hepatol* 19,319–326,2004.
21. Riesenbergr 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.
22. Feder-Mengus C, Wyler S, Hudolin T, Ruzsat R, Bubendorf L, Chiarugi A, Pittelli M, Weber WP, Bachmann 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.
23. Soliman HH. Jackson E. Neuger T. Dees EC. Harvey RD. Han H. Ismail-Khan R. Minton S. Vahanian NN. Link C. Sullivan DM. Antonia S. A first in man phase I trial of the oral immunomodulator. indoximod. combined with docetaxel in patients with metastatic solid tumors. *Oncotarget.* 2014 Sep 30;5(18):8136-46.
24. Iversen TZ, Engell-Noerregaard L, Ellebaek E, Andersen R, Larsen SK, Bjoern J, Zeyher C, Gouttefangeas C, Thomsen BM, Holm B, Thor Straten P, Mellempgaard A, Andersen MH, Svane IM. Long-lasting disease stabilization in the absence of toxicity in metastatic lung cancer patients vaccinated with an epitope derived from indoleamine 2,3 dioxygenase. *Clin Cancer Res.* 2014 Jan 1;20(1):221-32.
25. Werner ER, Werner-Felmayer G, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Wachter H. Influence of interferon-gamma and extracellular tryptophan on indoleamine 2,3-dioxygenase activity in T24 cells as determined by a non-radiometric assay. *Biochem J.* 1988 Dec 1;256(2):537-41.
26. De la Maza LM, Peterson EM. Dependence of the in vitro antiproliferative activity of recombinant human gamma-interferon on the concentration of tryptophan in culture media. *Cancer Res.* 1988 Jan 15;48(2):346-50.
27. Carlin JM, Borden EC, Sondel PM, Byrne GI. Biologic-response-modifier-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Immunol.* 1987 Oct 1;139(7):2414-8.

28. Byrne GI, Lehmann LK, Landry GJ. Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells. *Infect Immun*. 1986 Aug;53(2):347-51.
29. 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. Epub 2003 Sep 21.
30. Yang HJ, Yen MC, Lin CC, Lin CM, Chen YL, Weng TY, Huang TT, Wu CL, Lai MD. A combination of the metabolic enzyme inhibitor APO866 and the immune adjuvant L-1-methyl tryptophan induces additive antitumor activity. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010 Jul;235(7):869-76.
31. Huang TT, Yen MC, Lin CC, Weng TY, Chen YL, Lin CM, Lai MD. Skin delivery of short hairpin RNA of indoleamine 2,3 dioxygenase induces antitumor immunity against orthotopic and metastatic liver cancer. *Cancer Sci*. 2011 Dec;102(12):2214-20.
32. Yen MC, Weng TY, Chen YL, Lin CC, Chen CY, Wang CY, Chao HL, Chen CS, Lai MD. An HDAC inhibitor enhances cancer therapeutic efficiency of RNA polymerase III promoter-driven IDO shRNA. *Cancer Gene Ther*. 2013 Jun;20(6):351-7.
33. 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.
34. Hudolin T, Mengus C, Coulot J, Kastelan Z, El-Saleh A, Spagnoli GC. Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Gene Is a Feature of Poorly Differentiated Non-muscle-invasive Urothelial Cell Bladder Carcinomas. *Anticancer Res*. 2017 Mar;37(3):1375-1380.
35. Opitz CA, Litzenburger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S, Schumacher T, Jestaedt L, Schrenk D, Weller M, Jugold M, Guillemin GJ, Miller CL, Lutz C, Radlwimmer B, Lehmann I, von Deimling A, Wick W, Platten M. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2011 Oct 5;478(7368):197-203.
36. 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.
37. Vogel CF, Goth SR, Dong B, Pessah IN, Matsumura F. Aryl hydrocarbon receptor signaling mediates expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Oct 24;375(3):331-5.
38. Litzenburger 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.
39. 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.

40. 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.

41. 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.

42. Andersson P, McGuire J, Rubio C, Gradin K, Whitelaw ML, Pettersson S, Hanberg A, Poellinger L. A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jul 23;99(15):9990-5. Epub 2002 Jul 9.

43. Baker SC, Arlt VM, Indra R, Joel M, Stiborová M, Eardley I, Ahmad N, Otto W, Burger M, Rubenwolf P, Phillips DH, Southgate J. Differentiation-associated urothelial cytochrome P450 oxidoreductase predicates the xenobiotic-metabolizing activity of "luminal" muscle-invasive bladder cancers. *Mol Carcinog*. 2018 Jan 11.

44. Al-Dhfyhan A, Alhoshani A, Korashy HM. Aryl hydrocarbon receptor/cytochrome P450 1A1 pathway mediates breast cancer stem cells expansion through PTEN inhibition and β -Catenin and Akt activation. *Mol Cancer*. 2017 Jan 19;16(1):14.

45. Lanis JM, Alexeev EE, Curtis VF, Kitzenberg DA, Kao DJ, Battista KD, Gerich ME, Glover LE, Kominsky DJ, Colgan SP. Tryptophan metabolite activation of the aryl hydrocarbon receptor regulates IL-10 receptor expression on intestinal epithelia. *Mucosal Immunol*. 2017 Jan 18.

46. 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.

47. Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*, 57, 289-300.

48. Benjamini, Y., and Yekutieli, D. (2001). The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Annals of Statistics* 29, 1165-1188.

49. Prendergast GC, Malachowski WP, DuHadaway JB, Muller AJ. Discovery of IDO1 Inhibitors: From Bench to Bedside. *Cancer Res*. 2017 Dec 15;77(24):6795-6811.

50. van Baren N, Van den Eynde BJ. Tryptophan-degrading enzymes in tumoral immune resistance. *Front Immunol*. 2015 Feb 3;6:34.

51. Brito RB, Malta CS, Souza DM, Matheus LH, Matos YS, Silva CS, Ferreira JM, Nunes VS, França CM, Dellê H. 1-Methyl-D-tryptophan potentiates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in T24 human bladder cancer cells. *PLoS One*. 2015 Aug 12;10(8):e0134858.

52. Litzenburger UM, Opitz CA, Sahn 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.

53. Lamas B, Natividad JM, Sokol H. Aryl hydrocarbon receptor and intestinal immunity. *Mucosal Immunol*. 2018 Apr 7.

54. Kolluri SK, Jin UH, Safe S. Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as an anti-cancer drug target. *Arch Toxicol*. 2017 Jul;91(7):2497-2513.