



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM MEDICINA –  
CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ALINE DA SILVA**

**Influência do catabolismo do triptofano via indoleamina  
2,3dioxigenase sobre a indução da angiogênese por hipóxia no  
câncer de bexiga**

**SÃO PAULO 2021**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM MEDICINA –  
CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Influência do catabolismo do triptofano via indoleamina 2,3  
dioxigenase sobre a indução da angiogênese por hipóxia no câncer  
de bexiga**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Medicina da Universidade Nove de Julho como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina.

**Discente:** Aline da Silva

**Orientador:** Prof. Drº Humberto Dellê

**SÃO PAULO 2021**

Silva, Aline da.

Influência do catabolismo do triptofano via indoleamina 2,3 -dioxigenase sobre a indução da angiogênese por hipóxia no câncer de bexiga. / Aline da Silva. 2021.

77 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

Orientador (a): Prof. Dr Humberto Delle.

1. Angiogênese. 2. IDO. 3. Câncer de bexiga. 4. Hipóxia. 5. VEGF.

I. Delle, Humberto II. Título

CDU 616



São Paulo 10 de dezembro de 2021

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluna: **ALINE DA SILVA**

Título da tese: **INFLUÊNCIA DO CATABOLISMO DO TRIPTOFANO VIA INDOLEAMINA 2,3 – DIOXIGENASE SOBRE A INDUÇÃO DA ANGIOGÊNESE POR HIPOXIA NO CÂNCER DE BEXIGA.**

Presidente: PROF. DR. HUMBERTO DELLÉ \_\_\_\_\_

Membro: PROFA. DRA. MARIA APARECIDA DALBONI \_\_\_\_\_

Membro: PROFA. DRA. MARIA FERNANDA DE SOUZA SETUBAL DESTRO \_\_\_\_\_

Membro: PROFA. DRA. ANA CAROLINA RAMOS MORENO \_\_\_\_\_

## Resumo

Dois fenômenos são determinantes para o desenvolvimento e progressão do câncer de bexiga (CB), a angiogênese e o escape imunológico, os quais se relacionam por meio de moléculas-chave especialmente induzidas em ambiente hipóxico controlado por HIF1alfa. A indoleamina 2,3-dioxigenase-1 (IDO1) é uma enzima imunomoduladora induzida por interferon-gama (IFN $\gamma$ ) que tem sido relacionada à angiogênese em algumas neoplasias. É possível que sua atividade seja modulada durante a hipóxia, repercutindo na inflamação local e na produção de novos vasos.

O objetivo do estudo foi verificar se a situação de hipóxia com alteração de HIF-1 $\alpha$  altera a expressão de IFN $\gamma$  e IDO1 e se a atividade da IDO1 influencia a angiogênese no CB. Em uma fase in vitro, células T24 foram submetidas à diferentes tempos de hipóxia com e sem recuperação da oxigenação. Foi usado também o CoCl<sub>2</sub> como estabilizador de HIF-1alfa sem hipóxia. HIF-1 $\alpha$ , VEGF-A, IFN- $\gamma$  e IDO1 foram analisados por ELISA ou qRT-PCR, e a atividade da IDO1 por meio da mensuração de L-quinurenina (HPLC). Em outra fase, células HUVEC foram incubadas com alta concentração de L-quinurenina e/ou com baixa concentração de triptofano para análise de tubos vasculares. Na fase in vivo, animais portadores de CB foram tratados com 1-metil-triptofano (inibidor da IDO1) para avaliação de angiogênese (imunohistoquímica para CD31).

Como resultados, a hipóxia aumentou IFN- $\gamma$ , enquanto a expressão e atividade de IDO diminuiu significativamente. A queda da expressão de IDO1 correlacionou-se negativamente com a expressão de VEGF-A. A simulação de um ambiente com alta concentração de L-quinurenina e baixa de triptofano diminuiu a formação de tubos vasculares. Em modelo animal, a inibição de IDO1 aumentou a formação de vasos sanguíneos.

Como conclusão, em CB, durante a hipóxia há aumento de IFN- $\gamma$ , porém há uma queda na expressão e atividade da IDO1, efeitos possivelmente mediados pelo HIF-1alfa. A baixa atividade da IDO1 durante a hipóxia favorece a angiogênese no CB.

**Palavras chaves: angiogênese, IDO; câncer de bexiga; hipóxia; VEGF**

## **Abstract**

Two processes are crucial for the development and progression of bladder cancer (BC), angiogenesis and immune escape, which are related through key molecules specially induced in a hypoxic environment controlled by HIF-1  $\alpha$ . Indoleamine 2,3-dioxygenase-1 (IDO1) is an immunomodulating enzyme induced by interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) that has been linked to angiogenesis in some neoplasms. It is possible that its activity is modulated during hypoxia, affecting local inflammation and the production of new vessels.

The aim of the study was to verify whether the situation of hypoxia with alteration of HIF1 $\alpha$  alters the expression of IFN- $\gamma$  and IDO1 and whether the activity of IDO1 influences angiogenesis in BC.

In an *in vitro* phase, T24 cells were subjected to different times of hypoxia with and without oxygen recovery. CoCl<sub>2</sub> was also used as a stabilizer for HIF-1  $\alpha$  without hypoxia. HIF-1 $\alpha$ , VEGF-A, IFN- $\gamma$  and IDO1 were analyzed by ELISA or qRT-PCR, and IDO1 activity by Lkynurenine measurement (HPLC).

In another phase, HUVEC cells were incubated with a high concentration of L-kynurenine and/or with a low concentration of tryptophan for analysis of vascular tubes. In the *in vivo* phase, CB-bearing animals were treated with 1-methyl-tryptophan (IDO1 inhibitor) to assess angiogenesis (CD31 immunohistochemistry).

As a result, hypoxia increased IFN- $\gamma$ , while IDO expression and activity significantly decreased. The decrease in IDO1 expression correlated negatively with VEGF-A expression. The simulation of an environment with a high concentration of L-kynurenine and a low concentration of tryptophan decreased the formation of vascular tubes. In an animal model, IDO1 inhibition increased blood vessel formation.

In conclusion, in BC, during hypoxia there is an increase in IFN- $\gamma$ , but there is a decrease in IDO1 expression and activity, effects possibly mediated by HIF-1 $\alpha$ . The low activity of IDO1 during hypoxia favors angiogenesis in BC.

**Key words: angiogenesis; IDO; bladder cancer; hypoxia; VEGF**

## SUMÁRIO

**Lista de abreviaturas**

**Lista de figuras**

**Resumo**

**Abstract**

<b>1</b>	<b>Introdução</b> .....	10
1.1	Câncer de bexiga (CB).....	10
1.2	Angiogênese tumoral.....	13
1.3	Angiogênese no CB.....	19
1.4	Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO).....	21
1.5	IDO e angiogênese.....	24
1.6	IDO no ambiente hipóxico.....	26
1.7	Hipótese.....	28
<b>2</b>	<b>Objetivo</b> .....	29
2.1	Objetivo primário.....	29
2.2	Objetivo secundário.....	29
<b>3</b>	<b>Materiais e métodos</b> .....	30
3.1	<b>Fase in vitro: cultura celular</b> .....	30
3.1.2	Indução da hipóxia.....	30
3.1.3	Ensaio de recuperação de hipóxia.....	32
3.1.4	Ensaio para formação de vasos.....	33
3.1.5	Imunoensaio enzimático (ELISA).....	34
3.1.6	Dosagem de L-quinurenina.....	35
3.1.7	RT PCR.....	36
3.2	<b>Fase in vivo: modelo animal de CB</b> .....	38
3.2.1	Animais .....	39
3.2.2	Inoculação com células MB49.....	39
.2.3	Grupos experimentais.....	40

3.2.4	Eutanásia dos animais.....	43
3.2.5	Análise histológica.....	44
3.3	<b>Análise estatística.....</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>68</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AkT</b>	Proteína quinase
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ATCC</b>	Sigla em inglês “American Type Cell Collection”
<b>BFGF</b>	Fator de crescimento fibroblástico básico
<b>CB</b>	Câncer de bexiga
<b>CBNMI</b>	Câncer de bexiga não músculo invasivo
<b>CEUA</b>	Comitê de ética no uso de animais
<b>Cm<sup>3</sup></b>	Centímetros cúbicos
<b>CoCl</b>	Cloreto de cobalto
<b>Ct</b>	Sigla em inglês “cycle threshold”
<b>DCNT</b>	Doenças crônicas não transmissíveis
<b>DFX</b>	Desferrioxamina
<b>DMOG</b>	Dimetiloxalilglicina
<b>DNA</b>	Sigla em inglês “deoxyribonucleic” - ácido desoxirribonucleico (ADN)
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
<b>dt</b>	Oligos dT
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidérmico
<b>ELISA</b>	Ensaio de imunoabsorção enzimática
<b>HCL</b>	Acido clorídrico
<b>HE</b>	Hematoxilina eosina
<b>HIF-1<math>\alpha</math>,</b>	Fator induzível por hipóxia
<b>HPLC</b>	Sigla em inglês “High performance liquid chromatography”
<b>HUVEC</b>	Células endoteliais humanas de cordão umbilical
<b>IDO</b>	Indoleamina 2,3-dioxigenase
<b>IHQ</b>	Imuno-histoquímica
<b>INCA</b>	Instituto nacional de câncer

<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>mg/kg</b>	Miligramas por quilogramas
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MMP</b>	Metaloproteinase
<b>MT</b>	Metil-triptofano
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato de sódio dibásico
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de sódio monobásico
<b>NMI</b>	Não músculo invasivo
<b>NOTCH</b>	Via de sinalização celular
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PDGF</b>	Fator de crescimento derivado de plaquetas
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PHD</b>	Prolil hidroxilase
<b>REC</b>	Recuperação de oxigênio
<b>RNA</b>	Sigla em inglês “ribonucleic acid” - ácido ribonucleico (ARN)
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>RT - PCR</b>	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>TBP</b>	do inglês TATA Box Protein
<b>TBS</b>	Solução Salina Tamponada
<b>TGFB</b>	Fator de transformação do crescimento beta
<b>uM</b>	Micromolar
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular,
<b>VEGFR</b>	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular
<b>vWf</b>	Fator de von Willebrand
<b>WHO/OMS</b>	Sigla em inglês “World Health Organization” - Organização mundial da saúde (OMS)
<b>Wnt</b>	Via de sinalização da Wnt

## LISTA DE FIGURAS

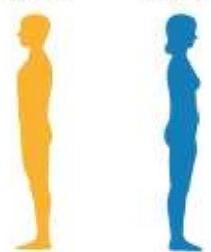
<b>Figura 1</b>	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes	<b>11</b>
<b>Figura 2</b>	Estadiamento do câncer de bexiga	<b>12</b>
<b>Figura 3</b>	Representação dos Hallmarks mais conhecidos	<b>14</b>
<b>Figura 4</b>	Regulamentação do HIF-1 $\alpha$ em situações de normóxia e hipóxia	<b>16</b>
<b>Figura 5</b>	Representação das etapas do processo de angiogênese	<b>19</b>
<b>Figura 6</b>	Esquema da indução de hipóxia	<b>31</b>
<b>Figura 7</b>	Placa de 6 poços com anaerogem e saco de selagem	<b>32</b>
<b>Figura 8</b>	Esquema básico dos procedimentos das amostras para ELISA	<b>34</b>
<b>Figura 9</b>	Esquema dos procedimentos das amostras para análise no HPLC	<b>35</b>
<b>Figura 10</b>	Animal imobilizado para avaliação do volume tumoral	<b>41</b>
<b>Figura 11</b>	Delineamento do estudo in vivo	<b>42</b>
<b>Figura 12</b>	Efeito da hipóxia sobre a estabilidade de HIF-1 $\alpha$ em células T24	<b>46</b>
<b>Figura 13</b>	Efeito da hipóxia sobre a expressão de IFN- $\gamma$ e IDO1 e sobre a 48 atividade enzimática da IDO1	
<b>Figura 14</b>	Efeito da hipóxia sobre a expressão de VEGF-A e IDO1	<b>50</b>
<b>Figura 15</b>	Efeito do MT sobre a formação de tubos vasculares in vitro	<b>52</b>
<b>Figura 16</b>	Densidade microvascular com coloração HE e marcação de endotélio 53 em modelo murino de tumor de bexiga	
<b>Figura 17</b>	Análise de imuno-histoquímica para CD31 em tumor de bexiga	<b>56</b>

# 1 Introdução

## 1.1 Câncer de Bexiga (CB)

As Doenças Crônicas Não-Transmissíveis (DCNT) - tais como doenças cardiovasculares, câncer, doenças respiratórias e diabetes - respondem por 80,7% dos óbitos e incapacitação em todo o mundo. Anualmente, essas doenças são responsáveis por cerca de 41 milhões de mortes no mundo<sup>1,2</sup>.

De todas as DCNT, o câncer foi considerado a segunda causa de mortalidade segundo a organização mundial da saúde (OMS), sua incidência até 2030 aumentará 82%, 70%, 58% e 40% em países de baixa, média-baixa, média-alta e alta rendas, respectivamente. Em uma projeção, estimou-se que até 2040 serão 37 milhões de novos casos<sup>1</sup>. Há estimativa de 625 mil novos casos no Brasil até 2022, com concentração de 60% na região sudeste<sup>2</sup>. Dentre os tumores mais comuns do sistema urinário, destacase o câncer de bexiga, ocupando o sétimo lugar de todos os cânceres em homens<sup>2</sup> (Figura 1).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%	
Próstata	65.840	29,2%		Homens	Mama feminina	66.280	29,7%	
Cólon e reto	20.520	9,1%			Mulheres	Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Cofo do útero	16.590	7,4%	
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%	
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%	
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%	
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%	
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%	
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%	
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%	

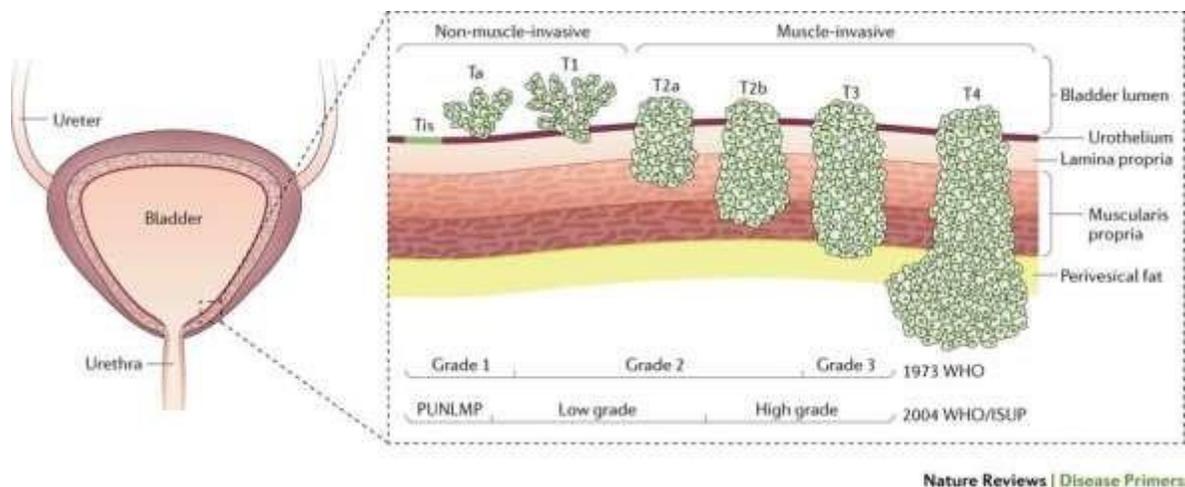


**Figura 1.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020<sup>2</sup>

Entre os principais tipos de câncer no Brasil está o CB, sendo o mais comum do trato urinário, associado a elevadas taxas de morbimortalidade quando não tratado corretamente<sup>2</sup>. Assim como a maioria dos cânceres, o CB tem forte relação com fatores ambientais, sendo o tabagismo um dos mais fortes fatores de risco<sup>3</sup>.

Os carcinomas uroteliais são os mais frequentes, correspondendo a 95% dos CB<sup>4</sup>. Aproximadamente 75% dos pacientes apresentam a forma não-músculo invasiva (NMI), desses 50% são classificados como baixo grau. Os outros 25% apresentam invasão no tecido muscular (forma músculo-invasiva, MI)<sup>4</sup>.

O estadiamento da versão NMI inclui os estádios Ta (carcinoma papilífero nãoinvasivo), T1 (o tumor invade o tecido conjuntivo subepitelial) e Tis (carcinoma plano *in situ*). Uma parcela significativa dos NMI (aproximadamente 25%) progride para a forma MI, sendo classificadas como T2 (invade musculatura da bexiga), T3 (invade tecido perivesical) e T4 (invade estruturas extravesicais como útero e próstata)<sup>5</sup>.



**Figura 2:** Estadiamento do CB dividido em dois grupos: não-músculo invasivo (à direita) e músculo invasivo (à esquerda)<sup>6</sup>.

Segundo a estimativa do INCA, de 2020 até 2022 ocorrerão 7.590 casos de CB em homens e 3.050 em mulheres em cada ano<sup>2</sup>. No mundo, de acordo com a WHO, o CB está entre as dez neoplasias malignas mais comuns, representando 3% da incidência e com 2,1% de mortalidade<sup>1</sup>.

A determinação do prognóstico é realizada pelo estadiamento patológico, o padrão ouro, que possui como fator de interferência a qualidade da amostra da ressecção transuretral e artefatos<sup>7</sup>.

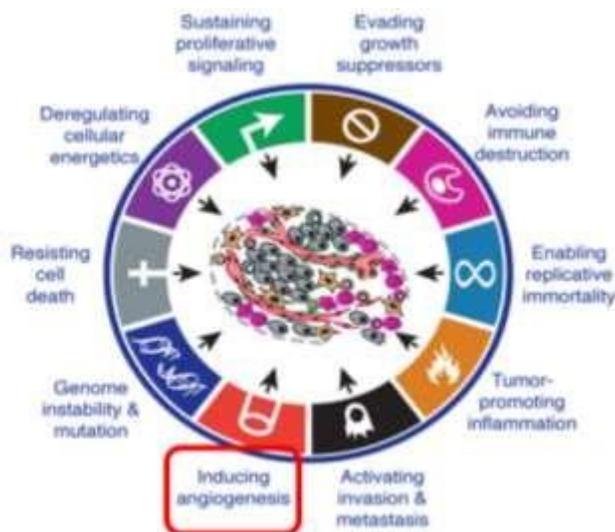
Além da ressecção do tumor, a terapia adjuvante com o Bacilo Calmette-Guérin (BCG) e a quimioterapia são os métodos terapêuticos mais utilizados no CB NMI, sendo a cistectomia radical com quimioterapia e radioterapia os métodos usados no CB MI, contudo, por mais que reduzam a morbimortalidade, a mortalidade ainda é alta<sup>4</sup>.

Acredita-se que o conhecimento ainda é limitado sobre os mecanismos moleculares que desenvolvem a transformação neoplásica das células uroteliais e a progressão do CB. Conseqüentemente, pesquisas são necessárias sobre marcadores urinários, mecanismo de progressão tumoral e metástase, uma vez que se trata de um problema mundial, que ceifa a vida de muitas pessoas, todos os dias, em todos os continentes.

*O CB é um problema de saúde pública. Embora existam tratamentos eficazes, a taxa de recidiva e progressão ainda é alta, aumentando a morbimortalidade.*

## **1.2 Angiogênese tumoral**

Desde que Hanahan e Weinberg propuseram os “Hallmarks of câncer” (Figura 3) no começo deste século, a angiogênese vem se concretizando cada vez mais como uma das principais características dos tumores malignos, participando diretamente e indiretamente da progressão tumoral <sup>8,9</sup>.



**Figura 3:** Representação dos marcadores mais conhecidos. Em destaque a angiogênese que também contribui para o desenvolvimento e progressão do câncer<sup>8</sup>.

Por definição, a angiogênese é um processo no qual novos vasos sanguíneos são gerados a partir de vasos pré-existentes. Em tumores sólidos, a angiogênese passa a ter um papel fundamental no desenvolvimento e na progressão tumoral, levando à ideia de que terapias antiangiogênicas possam ter potenciais contra o câncer. Não só por oferecerem mais oxigênio, mas os vasos formados promovem a retirada do gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e dos resíduos metabólicos que representam um importante risco para a proliferação tumoral<sup>10,11</sup>.

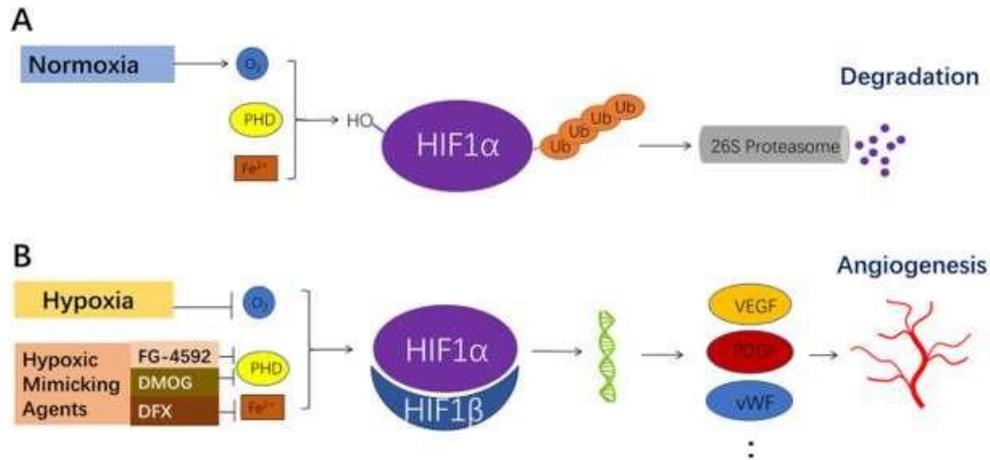
Além das células neoplásicas sofrerem hipóxia pelo rápido crescimento tumoral, elas podem deslocar as células saudáveis adjacentes, expondo-as gradualmente a uma menor quantidade de nutrientes e oxigênio e, conseqüentemente, irão contribuir para o desencadeamento da angiogênese<sup>12</sup>.

A hipóxia, portanto, é o fator mais importante para indução da angiogênese. Em primeiro lugar, a célula precisa perceber a queda da pressão de oxigênio em seu interior.

O mecanismo por trás deste sensor foi pesquisado por décadas e rendeu o prêmio Nobel em 2019 para os pesquisadores William G. Kaelin, Peter J. Ratcliffe e Gregg L. Semenza. Semenza e Wang demonstraram que fatores induzidos pela hipóxia eram capazes de translocar-se para o núcleo da célula, a fim de influenciar a expressão gênica<sup>13</sup>. Esses fatores são reconhecidos como fatores induzidos por hipóxia – HIF (do inglês *Hypoxiainducible factors*), apresentando-se como HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ , sendo a isoforma 1 $\alpha$  a mais estudada (HIF-1 $\alpha$ )<sup>14</sup>.

O gene HIF-1 $\alpha$  é expresso constitutivamente em células humanas, porém a meia vida da proteína HIF-1 $\alpha$  é muito curta, ou seja, sua degradação é imediata, desde que haja oxigênio suficiente para garantir a atividade das enzimas prolil-hidroxilases, altamente dependentes do oxigênio<sup>15,16</sup>.

Assim, na vigência de oxigênio, o HIF-1 $\alpha$  é hidroxilado, reage com a proteína Hippel-Lindau para sua ubiquitinação, sendo então destruído pelo sistema proteossomal<sup>17,18</sup>. Já na vigência de hipóxia, o HIF-1 $\alpha$  mantém-se íntegro pela ineficiência das prolil-hidroxilases, transloca-se para o núcleo, ligando-se ao HIF-1 $\beta$  para a formação de um dímero que, associado a proteínas coativadoras, ligar-se-á ao elemento de resposta à hipóxia, dirigindo a expressão de muitos genes, dentre os quais estão os genes indutores da angiogênese (Figura 4). Além deste mecanismo induzido pela carência de oxigênio, a atividade das prolil-hidroxilases também é inibida pela quelação do ferro, ocorrendo a ativação do HIF-1 $\alpha$ <sup>19</sup>.



**Figura 4.** HIF-1 $\alpha$  como mediador da angiogênese. (A) Células em condições normais de oxigênio degradam o HIF-1 $\alpha$  por meio das enzimas proil-hidroxilases (PHDs), altamente dependentes de oxigênio e Fe<sup>++</sup>. Resumidamente, a hidroxilação do HIF-1 $\alpha$  favorece sua ubiquitinação, sendo posteriormente degradado pelo sistema proteossomal. (B) Na situação de hipóxia ou na presença de agentes quelantes de ferro, as PHDs ficam sem atividade, permitindo a translocação do HIF-1 $\alpha$  na forma de dímero com HIF1 $\beta$  para o núcleo da célula, modulando a expressão de genes que promovem a angiogênese<sup>20</sup>.

Diversas moléculas que estimulam a angiogênese já foram caracterizadas, destacando-se o fator de crescimento de endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*) e seus receptores tirosina quinase (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3)<sup>21</sup>.

A família VEGF engloba as proteínas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e PlGF. O VEGF é uma glicoproteína que além de aumentar a permeabilidade vascular, apresenta importante papel na migração, proliferação, formação do vaso e sobrevivência da célula endotelial<sup>22</sup>. A sinalização ativada principalmente pela ligação do VEGF-A ao receptor VEGFR2 regula a atividade de diversas proteínas, as quais promovem proliferação e migração celular, sobrevivência e permeabilidade vascular durante o processo angiogênico. O VEGF-A está presente durante o desenvolvimento

embrionário dos vasos sanguíneos. Já na vida adulta, os níveis de VEGF não são muito altos, exceto nos locais onde a angiogênese se faz necessária. Nos tumores, o aumento da expressão do VEGF promove o aumento da vascularização e da permeabilidade vascular<sup>21</sup>.

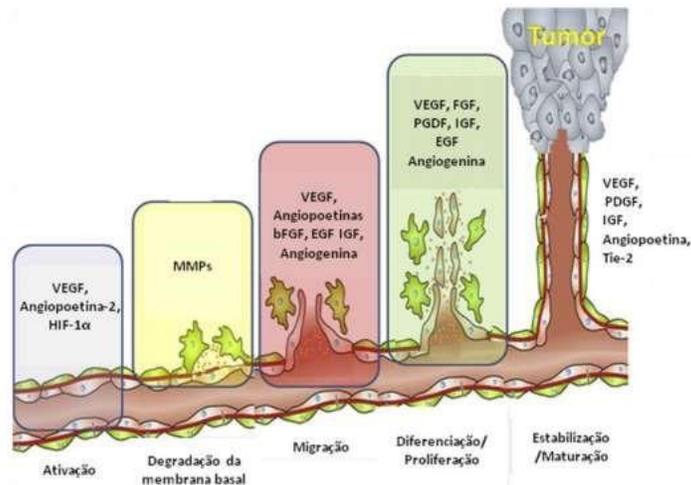
Durante o processo de angiogênese, ocorre a ativação de células endoteliais quiescentes por fatores liberados pelas células tumorais em resposta a privação de nutrientes e oxigênio. Fatores como VEGF e Angiopoitina-2 atuam nos vasos pré-existentes aumentando a permeabilidade vascular. Em seguida, ocorre a degradação da membrana basal e da matriz extracelular, permitindo a migração de células endoteliais e liberação de mais fatores pró-angiogênicos. Ocorre então a migração e proliferação de células endoteliais para a formação de um tubo, bem como o recrutamento e diferenciação de células de suporte perivascular (pericitos)<sup>23</sup>. Neste processo de recrutamento celular destaca-se a via de sinalização NOTCH.

Nota-se que a via de sinalização de NOTCH é fundamental para a biologia do desenvolvimento, tendo papel na diferenciação, proliferação, sobrevivência celular e, conseqüentemente, está associada a diversos processos como neurogênese, angiogênese, hematopoiese, entre outros<sup>24</sup>. A família NOTCH é subdividida em quatro genes: Notch1, Notch2, Notch3 e Notch4, que são transcritos em proteínas, as quais agem como receptores transmembranas com diferentes funções. Estes receptores são expressos em diferentes tipos de células e atuam na diferenciação, escolha e especificação de destino e proliferação celular. A ativação destes receptores é

normalmente induzida pela associação a ligantes expressos por células vizinhas, dentre eles: Delta-like-1, Delta-like-3, Delta-like-4, Jagged-1 e Jagged-2<sup>25,26</sup>.

A via Notch leva ao aumento de brotamento e ramificação dos vasos sanguíneos, uma vez que conduz à formação de células *tip* e *stalk*, responsáveis pela migração e proliferação, respectivamente<sup>21</sup>. Pode-se dizer que ela regula a ramificação, influenciando a diferenciação, migração e proliferação de células vasculares, além de regular a diferenciação de células musculares lisas vasculares em resposta à lesão vascular<sup>27,28</sup>.

Portanto, a via Notch está ativa em tumores como câncer de mama, cólon, pâncreas, próstata e sistema nervoso central<sup>29</sup>. Já foi demonstrado que há relação entre a via Notch e outras vias de sinalização, como as vias TGF $\beta$ , Wnt e Akt<sup>30</sup>. Ao final, ocorre a maturação e estabilização dos novos vasos formados com a participação de fatores como a angiopoitina-1 e seu receptor Tie-2<sup>31</sup>.



**Figura 5.** Representação das etapas do processo de angiogênese com a participação de fatores próangiogênicos. Ao final, ocorre a maturação e estabilização dos novos vasos formados<sup>32</sup>.

*Pelo exposto acima, a angiogênese é um processo fisiológico mediado pelo HIF1 $\alpha$ , porém acontece na tumorigênese, favorecendo o desenvolvimento e progressão tumoral.*

### 1.3 Angiogênese no CB

Assim como ocorre em outros tipos tumorais, a angiogênese é um importante fenômeno para a progressão do CB.

Theodoropoulos e colaboradores analisaram por imunohistoquímica a expressão de HIF-1 $\alpha$ , VEGF e CD31 (marcador de endotélio), além de marcadores de proliferação e de apoptose em espécimes de CB oriundos de 140 pacientes. Demonstraram que a expressão proteica de HIF-1 $\alpha$  foi mais frequente em tumores de alto grau, correlacionando-se positivamente com a taxa proliferativa, com a densidade capilar e com apoptose. A expressão de HIF-1 $\alpha$  correlacionou-se inversamente com a sobrevida livre

de progressão<sup>33</sup>. Em outro estudo, Chai e colaboradores avaliaram a expressão imunohistoquímica de HIF-1 $\alpha$  em espécimes de 99 pacientes com CB e demonstraram que a expressão de HIF-1 $\alpha$  estava presente em 56% dos casos, correlacionando-se positivamente com o tamanho tumoral, grau histológico, invasão tumoral e recorrência. Na análise multivariada, a expressão de HIF-1 $\alpha$  foi apontada como fator independente para sobrevida livre de doença<sup>34</sup>.

Ainda na mesma linha de pesquisa, Deniz e colaboradores avaliaram a expressão proteica de HIF-1 $\alpha$  em tumores de 70 pacientes, demonstrando que HIF-1 $\alpha$  teve uma relação positiva com o estágio da doença, com o grau histológico, bem como com a atividade proliferativa das células neoplásicas, reforçando a ideia de que a expressão de HIF-1 $\alpha$  correlaciona-se com a evolução da doença, inclusive apontando HIF-1 $\alpha$  como um candidato a marcador prognóstico no CB<sup>35</sup>.

Conforme discutido anteriormente, a angiogênese é induzida pelo VEGF. Sendo assim, a expressão de VEGF também vem sendo estudada na relação entre angiogênese e CB. Atualmente, a literatura oferece um elevado número de estudos correlacionando a expressão de VEGF com progressão de CB. Por exemplo, uma meta-análise conduzida por Chen e colaboradores e publicada em 2020 revelou que existem mais de 50 estudos com análise de polimorfismo de genes relacionados ao VEGF em CB<sup>36</sup>. Além do VEGF, seus receptores têm sido relacionados com a progressão do CB. Kopparapu e colaboradores avaliaram a expressão de VEGF e seus receptores VEGFR1 e VEGFR2 em 212 espécimes de CB humano e em 131 espécimes de tecido vesical normal e demonstraram que a expressão de VEGF e seus receptores foi maior em CB do que em

tecido vesical normal. Com relação à evolução da doença, a expressão de VEGFR1 foi maior em CB NMI, enquanto a expressão de VEGFR2 foi maior na forma MI, sugerindo que essas moléculas possam ter uma participação na fisiopatologia do CB<sup>37</sup>.

Levando em consideração o exposto acima, faz-se racional a utilização de terapias que visem o bloqueio deste eixo HIF-1 $\alpha$ /VEGF no CB. Atualmente, dispomos de anticorpos monoclonais, proteínas de fusão recombinantes, bloqueadores químicos de receptores tirosina-cinase, dentre outros que, provavelmente, assumirão o protagonismo no tratamento do CB. Na revisão de Mazzola e colaboradores, são revelados muitos estudos clínicos de fase I e II que miram o bloqueio do VEGF no tratamento de pacientes com CB<sup>38</sup>.

*Resumidamente, marcadores de angiogênese correlacionam-se com recidiva e progressão do CB. Pacientes portadores de tumores de bexiga com maior atividade angiogênica possuem pior prognóstico.*

#### **1.4 Indoleamina-2,3-dioxigenase-1 (IDO1)**

A IDO1 é uma proteína monomérica, codificada pelo gene *INDO*, presente no cromossomo 8. Possui um grupo heme entre seus dois domínios, tendo a protoporfirina IX como seu grupo prostético<sup>39</sup>. A IDO1 cliva o anel pirrólico do aminoácido triptofano, inserindo dois átomos de oxigênio nos carbonos 2 e 3<sup>40</sup>. Portanto, a IDO1 é dependente de O<sub>2</sub>. O produto dessa reação é a N-formilquinurenina, a qual será substrato para a formação de quinurenina e seus derivados. A atividade da IDO1 depende de sua forma ferrosa (Fe<sup>+2</sup>), ou seja, depende de agentes redutores já que, naturalmente, é encontrada

na forma férrica ( $\text{Fe}^{+3}$ )<sup>41</sup>. Além da isoforma 1, existe a IDO2<sup>42</sup>, bem como a TDO (triptofano dioxigenase), que se expressa constitutivamente, em especial, no fígado<sup>43</sup>.

Em termos de função biológica, quando a IDO1 foi descrita pela primeira vez em intestino de coelho na década de 60<sup>44</sup>, sendo relacionada a proteção do organismo contra a invasão e disseminação de microparasitas<sup>45</sup>, particularmente por tornar o microambiente desfavorável a proliferação desses microrganismos. A produção de IDO em macrófagos evidencia o papel da enzima no ataque contra esses microrganismos.

Acreditava-se que a indução de um microambiente desfavorável estivesse relacionada, exclusivamente, à atividade da IDO1 em degradar o aminoácido triptofano do microambiente<sup>45</sup>. Sem esse aminoácido essencial, microrganismos seriam incapazes de crescer. Atualmente, é consenso que os produtos da degradação do triptofano, os derivados da quinurenina são também determinantes para as ações locais da IDO1<sup>45,46</sup>.

Por meio de sua ação em degradar o triptofano e gerar os derivados da quinurenina, a IDO1 tem sido implicada em processos de imunomodulação desde que foi descrita na placenta, protegendo o tecido embrionário contra o sistema imune materno. Esse papel foi apontado por Munn e colaboradores na demonstração que existe um aumento significativo da expressão de IDO1 em células da placenta e a administração de metil-triptofano (inibidor da IDO1) causa rejeição do tecido embrionário em camundongos, mediada por linfócitos T<sup>47</sup>. A clivagem de triptofano promove acúmulo de metabólitos como o ácido 3- hidroxiantranílico, quinunenato e quinolinato, que em altas doses (>100 $\mu\text{M}$ ) causam inibição da proliferação de linfócitos e podem levar à apoptose dessas células<sup>46,48</sup>.

Não demorou muito para que a IDO1 fosse relacionada ao escape imunológico, um dos mais importantes *hallmarks* do câncer. Um estudo pioneiro foi o de Uyttenhove e colaboradores que demonstrou a expressão de IDO1 em diversos tipos tumorais. Os autores confirmaram que tumores com expressão de IDO1 tinham uma maior proteção contra a agressão imunológica<sup>49</sup>.

A expressão de IDO1 é induzida em situações inflamatórias e um dos principais fatores indutores é o interferon (IFN- $\gamma$ )<sup>50</sup>. Levando em consideração que há infiltrado inflamatório no microambiente tumoral, é plausível considerarmos a indução de IDO1 em células tumorais, já que linfócitos T intratumorais produzem IFN- $\gamma$ <sup>51</sup>. Linfócitos isolados de CB humano passam a produzir IFN- $\gamma$  quando cocultivados com células tumorais autólogas<sup>52</sup>. Esses achados representam um grande problema visto que uma das terapias adjuvantes utilizadas no CB é a vacina de BCG intravesical e essa é capaz de induzir aumentos dos níveis séricos de IFN- $\gamma$ , associados a diminuição de triptofano tanto por células imunes como não-imunes<sup>53</sup>.

Uma outra questão a ser esclarecida é como linhagens tumorais expressam constitutivamente IDO1, independentemente de estarem ou não em um ambiente inflamatório. Pesquisadores apoiam a ideia de que há eixos autócrinos que mantêm a expressão de IDO1 em células neoplásicas. Litzemberger e colaboradores demonstraram que células neoplásicas que expressam IDO1 constitutivamente acionam o receptor de hidrocarboneto de arila via quinurenina e seus derivados, que por sua vez induz a via STAT-3-IL-6, que aumenta a expressão de IDO1, estabelecendo-se um mecanismo autócrino de sustentação positiva da expressão de IDO1<sup>54</sup>.

*Resumidamente, a IDO1 é uma enzima que suprime o sistema imune localmente graças a sua atividade em depletar triptofano e gerar quinurenina e seus derivados no microambiente, uma ação que requer O<sub>2</sub>. Em tumores, a IDO1 pode ser produzida por células neoplásicas de maneira constitutiva ou induzida por citocinas como o IFN- $\gamma$ .*

### **1.5 Relação entre IDO1 e angiogênese**

A relação entre IDO1 e angiogênese tumoral tem sido apontada por alguns pesquisadores, porém os resultados ainda são inconclusivos.

Um dos primeiros estudos que correlacionaram IDO1 com vasos sanguíneos tumorais foi o de Riesenber e colaboradores. Demonstraram que células endoteliais de tumores renais expressam IDO1 e esta expressão correlaciona-se positivamente com maior sobrevida dos pacientes. Postularam nesse estudo que a expressão de IDO1 em neovasos estaria limitando a chegada de triptofano do sangue em direção às células neoplásicas, o que comprometeria a proliferação das mesmas<sup>55</sup>. Em contraste, Batista e colaboradores demonstraram que vasos sanguíneos de tumores cerebrais também expressam IDO1 no endotélio, porém encontraram uma relação positiva com o avanço da doença<sup>56</sup>. Esses estudos iniciais já mostravam a dificuldade na determinação do papel da IDO1 em vasos sanguíneos tumorais, inclusive com resultados contrastantes relacionados aos desfechos clínicos.

Nonaka e colaboradores induziram a expressão de IDO1 em células de tumor de ovário e demonstraram aumento do volume tumoral e disseminação, com aumento de vascularização. Contudo, como nesse estudo houve diminuição de células *Natural killer* intratumorais, não está claro se o aumento da vascularização foi um efeito direto da IDO1 sobre a angiogênese ou um efeito indireto promovido por seu efeito em induzir imunossupressão local, deixando mais livre a angiogênese da agressão imune antitumor<sup>57</sup>.

Trabalhando com camundongos nocauteados, Mondal e colaboradores demonstraram que animais nocautes para IDO ou para IL-6 têm diminuição de neovascularização, tanto em modelo de análise em retina como em modelo de tumor pulmonar. Além disso, quando trataram os animais com Epcadostat, um inibidor da IDO1, houve diminuição da angiogênese no mesmo modelo<sup>58</sup>. Mostraram, portanto, que a IDO1 é essencial para a formação de vasos, favorecendo o crescimento tumoral em pulmões. Reforçando a hipótese, Pan e colaboradores demonstraram que o silenciamento de IDO1 por meio de siRNA diminuiu a formação de vasos sanguíneos em modelo murino de tumor pulmonar<sup>59</sup>.

Com relação ao CB, pouco se sabe sobre a IDO1 na angiogênese. Um estudo demonstrou que o tratamento com 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<sup>60</sup>. Zhang e colaboradores estudaram o papel do microRNA-153 no CB. Demonstraram que esse microRNA tem ação antitumoral, inicialmente evidenciada pela

sua correlação negativa com a progressão do CB. Em seguida, demonstraram que o microRNA-153 inibe a IDO1 e a angiogênese no CB<sup>61</sup>. Contudo, não está claro se há um efeito direto da IDO1 sobre a angiogênese ou se seu efeito sobre a inflamação influencia indiretamente a angiogênese no CB.

*Resumidamente, há estudos que correlacionam a IDO1 com a angiogênese, porém são conflitantes. Em tumor renal, demonstrou-se que a presença de IDO1 diminui a angiogênese, já em tumor cerebral, de pulmão e de ovário, a presença de IDO1 favorece a angiogênese. Em CB, o efeito da IDO1 sobre a angiogênese é incerto.*

## **1.6 IDO1 no ambiente hipóxico**

Schmidt e colaboradores mimetizaram um ambiente hipóxico e avaliaram a expressão e atividade da IDO1 em células de glioblastoma humano e HeLa. Observaram que houve uma diminuição da expressão e conseqüentemente da atividade da IDO1 ao mensurarem quinurenina no sobrenadante dessas células. Tanto a ação antimicrobiana como a imunomoduladora foram perdidas pela situação de hipóxia. Ao devolverem oxigênio para as células, a atividade IDO foi restaurada<sup>62</sup>. Ainda em ambiente hipóxico, estudo com células endoteliais derivadas de monócitos tiveram a expressão proteica de IDO1 e sua atividade diminuídas na hipóxia, um efeito revertido pelo retorno do oxigênio<sup>63</sup>.

Nohapatra e colaboradores realizaram um estudo com células de glioblastoma. Submeteram as células à hipóxia e avaliaram a expressão de TDO2, uma isoforma que também degrada triptofano gerando quinurenina e seus catabólitos. Sob hipóxia, as células de glioblastoma tiveram uma redução significativa da expressão e atividade da

TDO2, um efeito que foi revertido pela inibição de HIF-1 $\alpha$  por meio de siRNA<sup>64</sup>. Mais interessante ainda, a hipóxia interferiu na habilidade das células tumorais suprimirem a proliferação de linfócitos T<sup>64</sup>.

Liu e colaboradores avaliaram o efeito da hipóxia sobre a expressão de IDO1 em células de câncer de ovário cocultivadas com linfócitos T reguladores (Treg), linfócitos T citotóxicos e células Natural Killer (NK). Demonstraram que a hipóxia diminuiu significativamente a expressão de IDO1, um efeito amenizado pela presença de linfócitos Treg. A hipóxia intensificou a apoptose de células neoplásicas incubadas com linfócitos T citotóxicos e células NK, e a presença de linfócitos Treg amenizou esse efeito, além de aumentar a habilidade de invasão das células<sup>65</sup>.

*Resumidamente, a situação de hipóxia diminui a expressão e atividade de IDO1 e este efeito está relacionado ao HIF-1 $\alpha$ .*

## **1.7 Hipótese**

A IDO1, uma molécula reconhecida como imunomoduladora, tem sido relacionada à angiogênese em alguns tipos de câncer, porém com resultados conflitantes. No CB esta participação da IDO1 sobre a angiogênese ainda não está clara. É possível que a IDO1 seja modulada durante a hipóxia e isso favoreça a formação de vasos no CB.

## 2 Objetivos

### Objetivo primário

Verificar se a situação de hipóxia com alteração de HIF-1 $\alpha$  altera a expressão de IFN- $\gamma$  e IDO1 e se a atividade da IDO1 (Quinurenina) influencia a angiogênese no CB.

### Objetivo secundário

Mais especificamente:

- Analisar a expressão de IFN- $\gamma$  e IDO1, bem como sua atividade em situação de hipóxia e recuperação de hipóxia;
- Verificar se há associação entre HIF-1 $\alpha$  e IDO1 por meio da estabilização de HIF-1 $\alpha$  com CoCl<sub>2</sub>;
- Correlacionar a expressão de IDO1 com a expressão de VEGF-A na situação de hipóxia;
- Averiguar se a atividade enzimática da IDO1 influencia a formação de vasos *in vitro*;
- Apurar se o tratamento com inibidor de IDO1 influencia a formação de vasos em modelo animal de CB.

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1 Fase *in vitro*: Cultura de células T 24 e células Huvec**

Foram utilizadas células humanas de carcinoma de bexiga (T24, grau 3) e células endoteliais humanas de cordão umbilical (HUVEC). Ambas as células mantidas em cultura com meio RPMI 1640 (Vitrocell, Campinas, São Paulo), suplementado com 10 % soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 mg/ml) a 37 °C com 5 % CO<sub>2</sub>. A linhagem T24 é proveniente da American Type Cell Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA) e foi adquirida comercialmente do banco de dados da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Associação Técnico Científica Paul Ehrlich).

#### **3.1.2 Ensaio de indução de hipóxia**

A hipóxia foi induzida com a utilização de saches de AnaeroGen (Compaq AN0010C, Oxoid, Cambridge, UK). Este produto foi desenvolvido para o cultivo de bactérias anaeróbias, já que captura o oxigênio do ambiente. Nosso grupo padronizou sua utilização para a indução de hipóxia em células tumorais humanas<sup>66</sup>.

Foram semeadas células T24 (200 mil células/poço) em placas de 6 poços. Ao atingirem 75-80% de confluência, as placas foram colocadas em sacos plásticos com um sache de Anaerogen. Cada saco plástico contendo a placa de 6 poços e o sache de Anaerogen foi selado e levado à estufa 37° C a 5%CO<sub>2</sub> (Figura 6).

As seguintes situações foram estudadas, em diferentes períodos de hipóxia, sempre em triplicata:

- Grupo controle (sem hipóxia por 48hs),
- Grupo controle de hipóxia química com cloreto de cobalto (CoCl<sub>2</sub>) pois o CoCl<sub>2</sub> é um quelante de Ferro e instabiliza o HIF-1 $\alpha$  (controle por 48hs)
- Grupos com 1h, 8h, 24h e 48hs de hipóxia com Anaerogen.



**Figura 6:** Esquema da indução de hipóxia. Células T24 em placas de 6 poços, junto com um sachê capturador de O<sub>2</sub>. As placas foram seladas e incubadas em estufa de 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por diferentes períodos. Fonte Aline, 2019

Ao final dos períodos estipulados, os sacos plásticos contendo a placa de 6 poços mais o sachê de Anaerogen foram resfriados por 10 minutos a 4-8°C (refrigerador), para coleta do sobrenadante e das células. Este resfriamento foi padronizado por nosso grupo para baixar o metabolismo das células e, desta maneira, não haver degradação instantânea do HIF-1 $\alpha$  com a abertura do saco plástico e entrada de ar atmosférico. Os sobrenadantes foram colocados em microtubos identificados e armazenados em -80°C.

Retirados os sobrenadantes, todos os poços foram lavados com 1 ml de PBS gelado e em seguida 200  $\mu$ L de tampão de lise foram adicionados em cada poço a fim de destruir as células utilizando espátula de plástico. O lisado celular de cada poço

(homogenato) foi transferido para microtubos, sendo mantido em gelo por 15 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 2.000 G por 5 minutos e o sobrenadante armazenado em freezer a -80C para quantificar proteína pela técnica de Bradford e ELISA.

O controle em normóxia foi incubado sob as mesmas condições (37° C a 5% CO<sub>2</sub>), assim como o cloreto de cobalto (utilizado como controle para a detecção da proteína HIF-1 $\alpha$ ), porém sem selamento do saco plástico.



**Figura 7:** Placa de 6 poços com Anaerogen e saco de selagem antes de ser levada à estufa (37° C a 5% CO<sub>2</sub>). Fonte Jonas, 2017

### 3.1.3 Ensaio de recuperação de hipóxia

Para o ensaio de recuperação de hipóxia, foram semeadas células T24 (200 mil células/poço) em placas de 6 poços. Ao atingirem 75-80% de confluência, as placas foram colocadas em sacos plásticos com um sachê de AnaeroGen (Compaq AN0010C, Oxoid, Cambridge, UK). Cada saco plástico contendo a placa de 6 poços e o sachê de Anaerogen foi selado e levado à estufa 37° C a 5%CO<sub>2</sub> e seguir com os tempos de hipóxia a serem estudados, nesse estudo foi realizado 48horas de hipóxia logo após esse período

retirou-se o saco e o sache para as células respirarem por 24 horas normalmente em estufa 5%CO<sub>2</sub>.

Em seguida, os sobrenadantes foram colocados em microtubos identificados e armazenados em -80°C. Todos os poços foram lavados com 1 ml de PBS gelado e em seguida 200 µL de tampão de lise foram adicionados em cada poço a fim de destruir as células utilizando espátula de plástico. O lisado celular de cada poço (homogenato) foi transferido para microtubos, sendo mantido em gelo por 15 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 2.000 G por 5 minutos e o sobrenadante armazenado em freezer a -80°C para quantificar proteína pela técnica de Bradford e ELISA.

### **3.1.4 Ensaio para formação de tubos vasculares**

Células HUVEC foram subcultivadas com meio de cultura RPMI 1640 a 10% SFB e antibióticos. No dia do experimento, as células Huvec foram tripsinizadas e semeadas em Matrigel solidificado em placa de 48 poços (triplicata). Após 24 horas, as células foram incubadas com quatro tipos de meio sendo eles: 1) RPMI 1640 normal (controle); 2) RPMI 1640 normal contendo com L-quinurenina (0,5 mM), 3) RPMI 1640 sem triptofano; e 4) RPMI sem triptofano contendo L-quinurenina (0,5 mM).

Após 24 horas de incubação, foi iniciada a contagem de “pseudovasos” formados em cada poço a cada 24 horas, por 5 dias consecutivos. Todas em triplicata. A contagem foi realizada sob aumento de 10x. Os meios foram trocados em dias alternados. Passados os 5 dias de contagem de pseudovasos formados por células HUVECs em 10 campos/poço, imagens de cada poço foram capturadas pelo microscópio de

fluorescência ZOE (BioRad) para ilustração.

### 3.1.5 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

Os homogenatos celulares foram analisados em triplicata utilizando os kits de ELISA Human IDO (Elabscience®, Wuhan, Hubei, China), Human/Mouse Total HIF-1 alpha DuoSet IC ELISA (R&D Systems® Mineápolis, Minnesota, EUA) e Mouse IFN- $\gamma$  (BioLegend's ELISA MAX™ Standard Set) seguindo os protocolos dos fabricantes. Foi realizada triplicata experimental nos kits utilizados. A densidade óptica de cada amostra foi medida em 450 nm e comparada com uma curva padrão. Entretanto, antes de realizar esses métodos os níveis de proteínas totais foram analisados pelo método de Bradford, visando corrigir as dosagens de HIF-1 alfa, IDO e IFN- $\gamma$ .



**Figura 8:** Esquema resumido do procedimento para ELISA. Transferência do lisado celular de cada grupo de estudo e armazenamento em tubo e congelamento para análise na técnica de ELISA.

### 3.1.6 Dosagem de L-quinurenina

A L-quinurenina foi dosada por meio de HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*). O sobrenadante de cultura foi preparado da seguinte forma para

dosagem de L-quinurenina: 0,5 mL de amostra foi misturada com 0,5 mL de ácido tricloroacético 10 % por 1 minuto em vortex e em seguida a mistura foi centrifugada em refrigeração a 4°C a 5.000 G por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,22 µm de diâmetro (Millipore, Massachusetts, EUA) e injetado (20 µL) no sistema Agilent 1100 do HPLC (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), equipado com uma coluna C18. A L-quinurenina foi identificada em comprimento de onda de 254 nm.



**Figura 9:** Esquema dos procedimentos das amostras para análise no HPLC. Transferência do sobrenadante de cultura e armazenamento em tubo e congelamento para análise em HPLC.

A fase móvel utilizada foi de acetonitrila e tampão de acetado de sódio (4:96, v/v), com pH de 4,7. Uma pré-coluna de 12,5 X 4,6 mm (820950-926, Agilent Eclipse, 5µm, Agilent Technologies, Califórnia, EUA) e a coluna analítica 4,6 x 100 mm (695970-902, Poroshell 120, EC-C18, 4µm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) foram utilizadas. Uma curva padrão foi construída para determinar a concentração das amostras (0,5 µM, 1,0 µM, 2,0 µM, 4,0 µM, 8,0 µM e 16,0 µM). Dessa forma, os picos foram observados com o 1220 Infinity II LC Gradient System (G4288B, Agilent Technologies, Santa Clara, EUA).

### 3.1.7 RT-PCR em tempo real

RNA total das células foi extraído com o kit PureLink® RNA Mini (Thermo Fisher Scientific, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Scientific, EUA), medindo-se a densidade óptica nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Quinhentos ng de RNA total foram utilizados. O cálculo da concentração de RNA, expresso em µg/mL, a partir da absorbância à 260nm. A leitura a 280 nm foi utilizada para determinar a contaminação das amostras com proteínas.

Para a síntese do cDNA, foi usado o kit de transcrição reversa *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher Scientific, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. A reação ocorreu no termociclador convencional (Applied Biosystems, Califórnia EUA).

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

Todos os primers foram testados previamente, realizando-se a curva de eficiência. Para tanto, o cDNA é diluído (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000) antes da realização da PCR em tempo real. Foram confeccionados pares de *primers* para a obtenção de *amplicons* com no máximo 250 pb.

Os primers que foram usados neste estudo estão apresentados na tabela 1. Como *housekeeping*, estamos utilizando o TBP (TATA box binding protein).

Após a PCR em tempo real, o cycle threshold (Ct) foi determinado para o gene housekeeping (TBP, do inglês TATA Box Protein) e para os genes alvo usando o auto baseline. A expressão relativa para cada gene foi determinada usando as fórmulas  $\Delta\Delta Ct$  ( $\Delta Ct$  housekeeping -  $\Delta Ct$  alvo) e  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

**Tabela 1:** primers utilizados para RT-PCR em tempo real

Gene alvo	Primer forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
TBP	TTCGGAGAGTTCTGGGATTGTA	TGGACTGTTCTTCACTCTTGGC
VEGF-A	AGAGATGCAACTAAGCCCTCT	AAGCAGCTACTGACAGGCAC
IDO1	CCTGGGGTACATCACCATGGCG	TTGCGGGGCAGCACCTTTTCG

### 3.2 Fase *in vivo*: Modelo animal de CB

Foi utilizada a linhagem celular MB49, que são células de carcinoma de bexiga de camundongos C57BL/6. Estas células foram doadas pelo Dr. Ivan P. Nascimento do Instituto Butantã, e mantidas em cultura no Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular da Universidade Nove de Julho – UNINOVE.

As células MB49 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Vitrocell, Campinas, São Paulo), suplementado com antibióticos (50 U/ml penicilina e 0,05 mg/ml estreptomicina) (Sigma Chemical Company, St Louis, MO), 2 mmol/L L-guatamina, além de 10% SFB (Vitrocell, Campinas, São Paulo). Mantidas sob condições adequadas em estufa com temperatura de 37° C e CO<sub>2</sub> a 5%.

Para determinar a taxa de crescimento das células MB49, foi realizado o ensaio de curva de crescimento. Células MB49 serão cultivadas e após atingirem confluência de aproximadamente 80%, tripsinizadas e aliqüotadas em 6 garrafas de 25 cm<sup>3</sup>. Cada garrafa subcultivada com 1X10<sup>5</sup> células. Para estabelecimento da taxa de crescimento, foram tripsinizadas a cada 24 horas e contadas através do método de azul de tripan em câmara de Neubauer. A partir dos dados deste experimento foi possível determinar o *doubling time* destas células que em média de 14,3 horas, ou seja, um crescimento extremamente rápido comparadas com outras células neoplásicas (média de 24 horas). Foram utilizadas a linhagem celular MB49, uma linhagem de células de carcinoma de bexiga de camundongos C57BL/6.

### **3.2.1 Animais**

Para esta etapa, foram utilizados camundongas da linhagem C57BL/6 (*mus musculus*, Rodentia, Mammalia), selecionadas entre seis e oito semanas de vida. Estes animais foram criados no biotério central da Universidade Nove de Julho, com o propósito de pesquisa científica. Os animais foram acondicionados sob condições normais com água e alimentação *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo

Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEUA) da Universidade Nove de Julho, processo AN 0015 2017.

### **3.2.2 Inoculação de células MB49**

Para a inoculação nos animais, as células MB49 em confluência de aproximadamente 80%, tripsinizadas e ressuspendidas em meio de cultura RPMI, 10% SFB e antibióticos. A viabilidade foi determinada através da exclusão por azul de tripan, onde a viabilidade celular no mínimo 90%. As células foram lavadas 2 vezes centrifugando-as em solução salina fosfato-tamponada (PBS) pH 7.4 a 125 G a 5 minutos, sendo posteriormente ressuspendidas em PBS na concentração de  $5 \times 10^3$  células MB49 por microlitro. Para a inoculação, um volume de 100  $\mu$ L desta solução, ou seja, um total de  $5 \times 10^5$  células.

O procedimento iniciou-se com a anestesia do animal através de injeção intraperitoneal de uma solução a base de cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina 2%, alcançando, respectivamente, as concentrações de 100 mg/kg e 10 mg/kg. Após sedação, o animal foi transferido para uma base cirúrgica aquecida. Os 100  $\mu$ L de PBS contendo as células são administrados no espaço subcutâneo da coxa direita, conforme literatura<sup>67</sup>.

### **3.2.3 Grupos experimentais**

Após aproximadamente 5 dias da inoculação, o diagnóstico do tumor foi feito pela visualização de uma massa de 2 mm de diâmetro, mensurada por meio de paquímetro.

Com o diagnóstico comprovado, os animais foram distribuídos em grupos, de acordo com o tratamento proposto e permanecer com 6-7 animais por grupo, conforme estabelecido previamente como ideal por meio de análise estatística do modelo com base no programa *G Power*<sup>68</sup>. Os dois grupos formados:

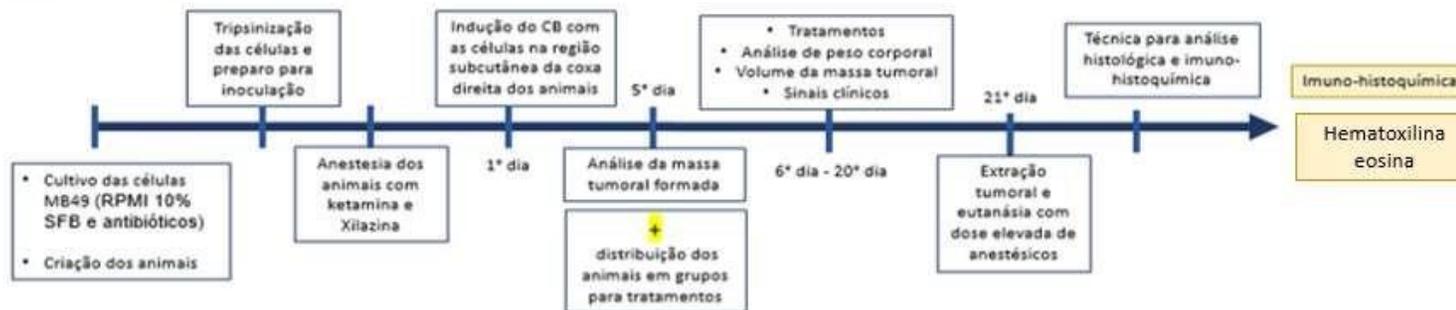
- Controle (n=6): Animais com tumor recebendo apenas os veículos dos tratamentos;
- MT (n=6): Animais com tumor recebendo 1-metil-D-triptofano (MT) diariamente (figura 11);

MT: O produto comercial 1-metil-D-triptofano (Sigma-Aldrich, EUA) em óleo de soja a uma concentração de 100 mg/ml. Assim, 1 ml/Kg administrado por gavagem uma vez ao dia, para uma dose final de 100mg/Kg (figura 11). Esta dose de MT sempre é previamente determinada pelo nosso grupo, com base na literatura<sup>69</sup>.



**Figura 10:** Imagem de animal imobilizado para avaliação do volume tumoral. Fonte: Aline, 2018

Os animais foram acompanhados por 3 semanas após início do tratamento, avaliando-se peso, volume tumoral e aspectos clínicos. Ao término do período de acompanhamento, os animais foram conduzidos à extração tumoral (dissecação) e eutanásia. O tumor foi seccionado em fragmentos de 5-10 mm, os quais foram fixados em formol tamponado (PBS) 10% para futura análise de imuno-histoquímica.



**Figura 11:** Delineamento do estudo in vivo<sup>69</sup>. Fonte Aline, 2018.

### **3.2.4 Eutanásia**

Para a eutanásia, os animais foram anestesiados para o procedimento de eutanásia, que foi realizada com quetamina e xilazina, pela via intraperitoneal, nas doses de 300 mg/Kg e 30 mg/Kg, respectivamente. Estas doses equivalem a três vezes a dose anestésica convencional, usadas como forma de eutanásia.

Caso os animais apresentassem sinais comportamentais de sofrimento como alteração de comportamento alimentar, perda de peso, pelo ouriçado e prostração, foram imediatamente conduzidos à eutanásia e contabilizados como óbito.

### **3.2.5 Análise histológica**

Tumores foram removidos antes de serem seccionados e fixados para análise histológica de hematoxilina eosina (HE) imuno-histoquímica.

Para a avaliação de marcação endotelial, foi usado o anticorpo anti-CD31 (Abcam, Cambridge, MA, EUA).

As lâminas passaram por um processo de desparafinização. Após 30 minutos em estufa a 60°C, as lâminas foram imersas em xilol durante 9 minutos, por 3 vezes. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 5 minutos (2 vezes), em etanol 96% por 3 minutos (2 vezes) e em água destilada. Finalizado o processo de desparafinização, as lâminas foram hidratadas em solução salina tris-tamponada (TBS, pH 7,6) ou em PBS (pH 7,4).

Após a remoção do álcool através de um banho em água destilada por 5 minutos, os tecidos foram submetidos à exposição antigênica, realizada por meio de aquecimento em câmara a vapor com tampão EDTA. A seguir, os cortes foram mergulhados em uma

solução de bloqueio de peroxidase endógena, composto por metanol e peróxido de hidrogênio (concentração final de 3%) protegidos da luz, por 30 minutos. Em seguida, procedeu-se o bloqueio composto por 6% de leite reidratado (Nestlé Brasil LTDA, São Paulo, Brasil) e albumina bovina a 1%. Na sequência, os cortes foram incubados com anticorpos primários, durante a noite, a 4° C. Como anticorpo primário, foi utilizado o CD31 (Abcam, Cambridge, MA, EUA). As secções foram incubadas com reagentes do kit EnV FLEX, High pH (K800021-2, Dako Co, Dinamarca). O mesmo kit forneceu o substrato para revelação à base de peroxidase.

A análise quantitativa das células positivas para o marcador em questão foi conduzida de forma cega, onde as células foram contadas sob ampliação microscópica de 400x e os resultados são expressos em número de células positivas por campo.

Para análise em HE, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (corantes específicos para evidenciar características estruturais do tecido em um microscópio de luz). Esta técnica permite verificar obtendo assim os dados morfológicos.

A aquisição das imagens foi realizada sob amplificação microscópica de 200x.

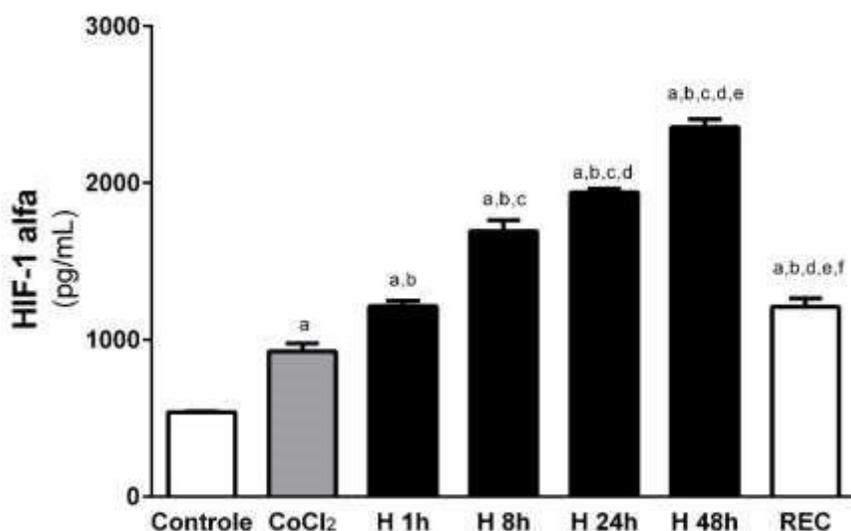
### **3.3 Análise estatística**

Teste T ou teste ANOVA One-Way com correção de Tukey foram usados nos estudos de cultura de células e com animais. A análise de correlação Spearman foi usada. A significância estatística foi considerada a partir do  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas com o programa IBM SPSS versão 22.

## 4 Resultados

### 4.1 Efeito da hipóxia sobre a estabilidade de HIF-1 $\alpha$ em células T24

A estabilidade de HIF-1 $\alpha$  foi verificada pela dosagem da proteína HIF-1 $\alpha$  no homogenato celular. Conforme demonstrado na Figura 12, a expressão de HIF-1 $\alpha$  aumentou significativamente nas células tratadas com CoCl<sub>2</sub> (utilizado como inibidor de degradação de HIF-1 $\alpha$ ). A figura também demonstra um aumento da concentração de HIF-1 $\alpha$  progressivamente com o tempo de hipóxia. Este resultado confirma a indução de hipóxia com o sistema Anaerogen. Após retorno do oxigênio (REC), houve uma redução do HIF-1 $\alpha$ , porém sem alcançar os níveis do Controle.

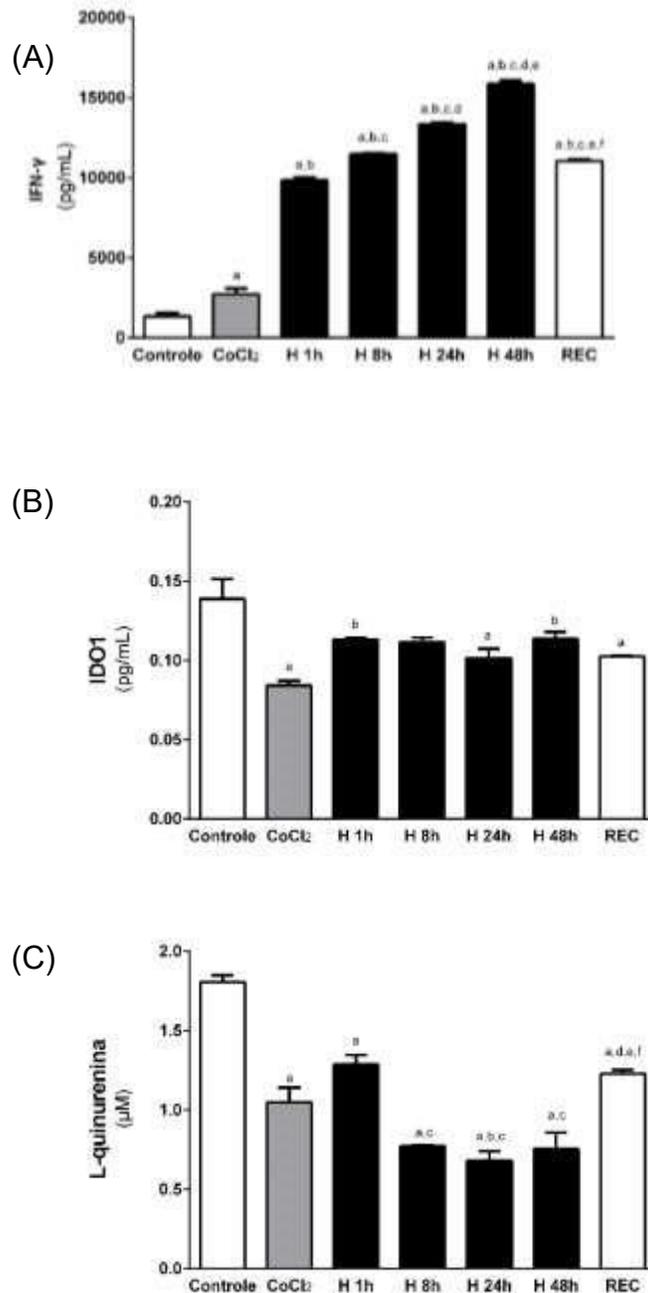


**Figura 12.** Concentração de HIF-1 $\alpha$  em homogenato de células T24 submetidas à normóxia (Controle), CoCl<sub>2</sub> e hipóxia por diferentes períodos. Observa-se um aumento de HIF-1 $\alpha$  em todas as condições. A recuperação do oxigênio reduziu o HIF-1 $\alpha$ . <sup>a</sup> p<0,05 vs. Controle, <sup>b</sup> p<0,05 vs. CoCl<sub>2</sub>, <sup>c</sup> p<0,05 vs. H 1h, <sup>d</sup> p<0,05 vs. H 8h, <sup>e</sup> p<0,05 vs. H 24h, <sup>f</sup> p<0,05 vs. H 48h.

## **4.2 Efeito da hipóxia sobre a expressão de IFN- $\gamma$ e IDO1 e sobre a atividade enzimática da IDO1**

Conforme demonstrado na Figura 13A, células T24 foram submetidas a incubação com  $\text{CoCl}_2$  e à hipóxia apresentando um aumento significativo de IFN- $\gamma$ , de maneira tempo dependente à hipóxia. A recuperação da oxigenação (REC) levou a uma queda do IFN- $\gamma$ , porém sem atingir os níveis do Controle em 24 horas.

Já a expressão de IDO1 foi reduzida significativamente com a incubação com  $\text{CoCl}_2$  e com os tempos de hipóxia. O retorno da oxigenação em 24 horas não foi suficiente para recuperação dos níveis normais de IDO1 (Figura 13B). O mesmo efeito foi observado com a atividade da IDO1. A concentração de L-quinurenina diminuiu significativamente no grupo de células incubadas com  $\text{CoCl}_2$  e hipóxia. A recuperação da oxigenação aumentou a atividade da IDO1, porém em 24 horas não foi suficiente para a recuperação total (Figura 13C).

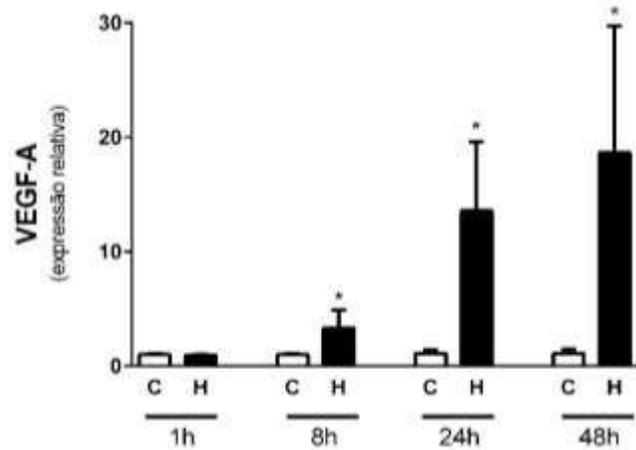


**Figura 13.** Células T24 submetidas a incubação com CoCl<sub>2</sub> e a hipóxia, e com recuperação de oxigenação (REC). (A) Observa-se aumento de IFN- $\gamma$  com a incubação com CoCl<sub>2</sub> e com a hipóxia de maneira tempo dependente, sendo que a recuperação de O<sub>2</sub> diminuiu o IFN- $\gamma$ . (B) Observa-se diminuição da concentração de IDO1 no homogenato de células T24 submetidas a CoCl<sub>2</sub> e a hipóxia. (C) Dosagem de L-quinurenina no sobrenadante de células T24 submetidas. Houve uma diminuição significativa de L-quinurenina com a incubação com CoCl<sub>2</sub> e com a hipóxia, sendo que a recuperação do O<sub>2</sub> aumentou a atividade da IDO1. <sup>a</sup> p<0,05 vs. Controle, <sup>b</sup> p<0,05 vs. CoCl<sub>2</sub>, <sup>c</sup> p<0,05 vs. H 1h, <sup>d</sup> p<0,05 vs. H 8h, <sup>e</sup> p<0,05 vs. H 24h, <sup>f</sup> p<0,05 vs. H 48h

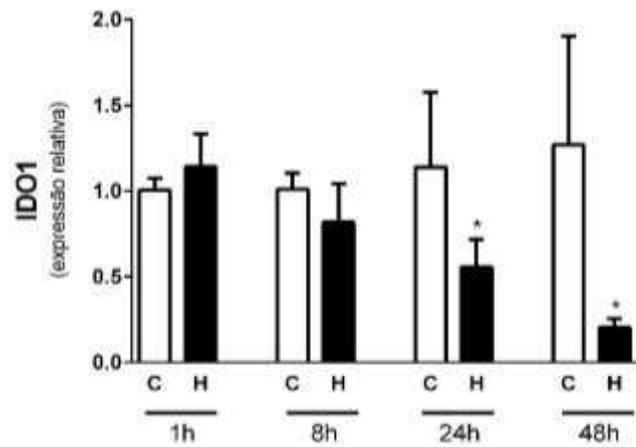
### **4.3 Efeito da hipóxia sobre a expressão de VEGF-A e IDO1**

A expressão de VEGF-A e IDO1 foi analisada por PCR em tempo real. Conforme demonstrado na Figura 14, a expressão de VEGF-A aumentou progressivamente com o tempo de hipóxia em célula T24. (Figura 14A) Em contraste, a expressão de IDO1 diminuiu gradativamente com o tempo de hipóxia. (Figura 14B) A expressão de VEGF-A correlacionou-se negativamente com a expressão de IDO1. (Figura 14C)

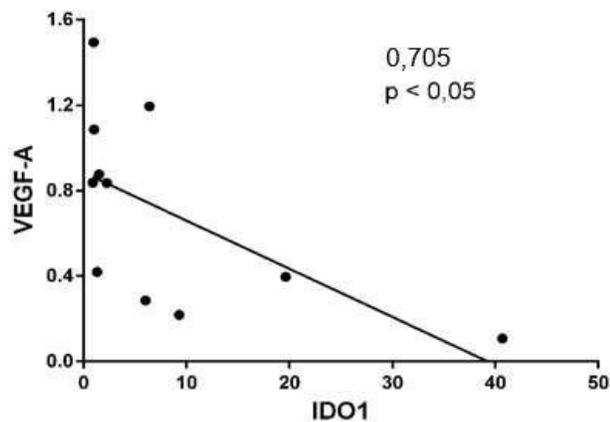
(A)



(B)



(C)

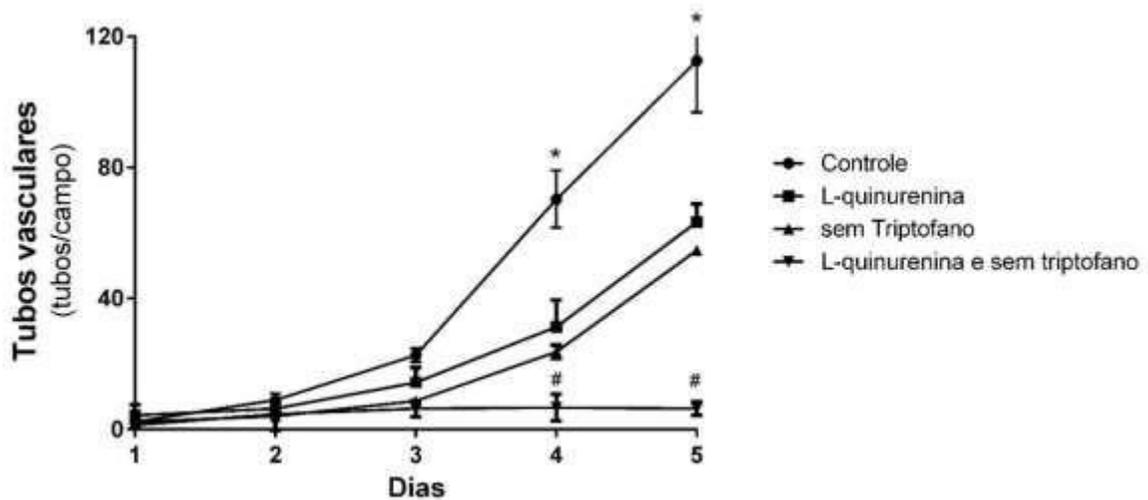
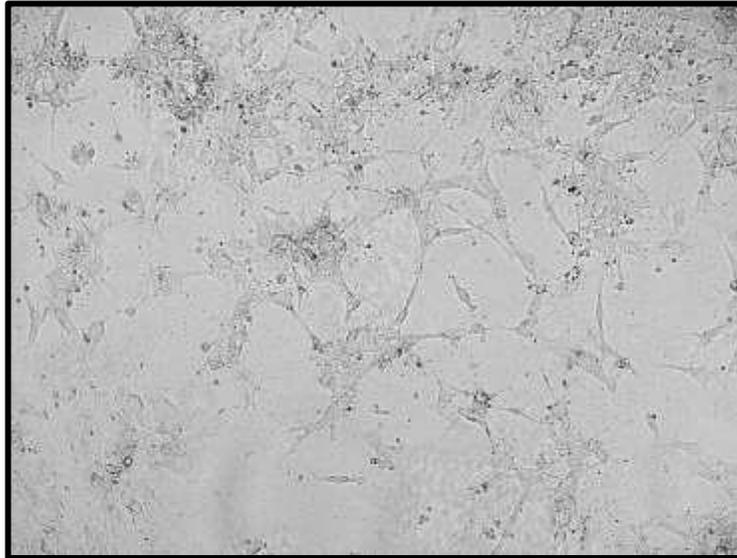


**Figura 14.** Expressão de VEGF-A e IDO1 avaliada por PCR em tempo real. (A) A expressão de VEGF-A aumentou significativamente com a hipóxia e de maneira tempo dependente. (B) Em contraste, a expressão de IDO1 diminuiu significativamente com a hipóxia, também de maneira tempo dependente. (C) A expressão de VEGF-A correlacionou-se negativamente com a expressão de IDO1 ( $p < 0,05$ ). \*  $p < 0,05$  vs. Controle correspondente ao tempo.

#### **4.4 Efeito da atividade da IDO1 sobre a formação de tubos vasculares *in vitro***

Para avaliação da angiogênese *in vitro*, optou-se por utilizar a contagem de tubos vasculares formados por células HUVEC. (Figura 15) Para avaliar o papel da IDO1 sobre a formação de tubos vasculares, a situação de aumento de L-quinurenina e/ou depleção de triptofano foi promovida.

A quantificação dos vasos formados nos quatro tipos de meio foi realizada em cada poço/grupo. Conforme demonstrado na Figura 15, tanto o aumento de L-quinurenina como a queda de triptofano no meio de cultura promoveram diminuição significativa na formação de tubos vasculares. Quando o aumento de L-quinurenina foi associado a diminuição de triptofano, o efeito inibitório de formação de tubos vasculares foi potencializado.



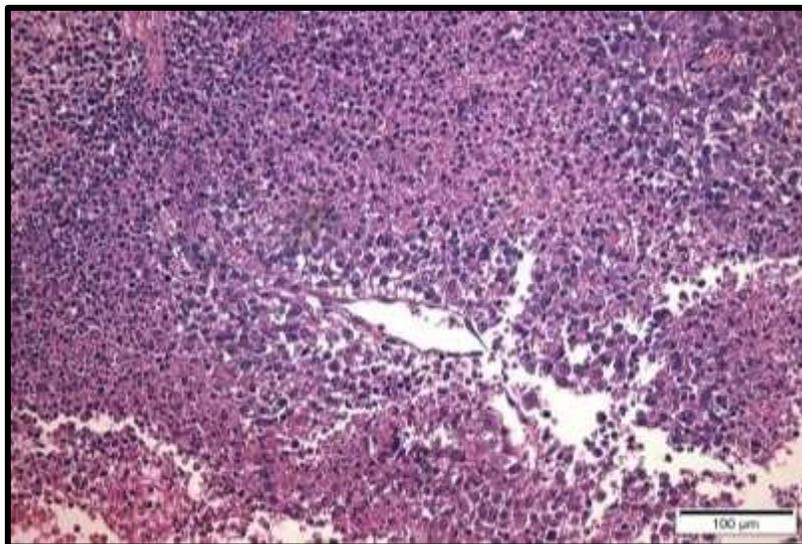
**Figura 15.** Análise de formação de tubos vasculares. Para mimetizar a ação local da IDO1, células HUVEC N=3 foram incubadas com 4 tipos de meio sendo eles: 1) RPMI normal (controle), 2) RPMI normal batizado com L-quinurenina, 3) RPMI livre de triptofano e 4) RPMI sem triptofano batizado com Lquinurenina. Conforme demonstrado no gráfico, a presença de L-quinurenina e a ausência de triptofano reduziram significativamente a formação de tubos vasculares. Quando as duas situações foram associadas, o efeito de inibição de formação de tubos vasculares foi intensificado. \*  $p < 0,05$  vs, Controle correspondente ao tempo; #  $p < 0,05$  vs. L-quinurenina e sem Triptofano correspondente ao tempo.

#### 4.5 Efeito do MT sobre a densidade microvascular com coloração HE e marcação de endotélio em modelo murino de tumor de bexiga

Para avaliação da densidade capilar, um modelo murino de CB foi usado.

Utilizou-se imuno-histoquímica para CD31 para identificação de células endoteliais. Conforme demonstrado na Figura 16 A, apresenta a lâmina onde o tumor nos animais do grupo MT foi seccionado e fixado para análise histológica de hematoxilina eosina (HE). Analisando a imagem capturada do mesmo local onde marcamos células endoteliais observamos uma possível formação de endotélio invadindo o tecido, presença de infiltrado inflamatório. Na figura 16B, foi possível marcarmos as células endoteliais de vasos formados nos tumores com MT. Todas as fotos foram capturadas em objetiva de 200 x.

(A)



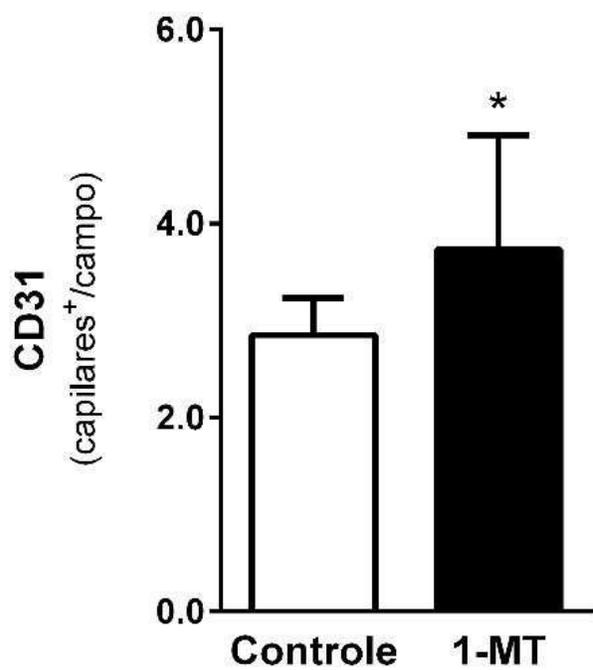
(B)



**Figura 16:** Imuno-histoquímica para CD31 em tumor de bexiga. Células MB49 foram inoculadas no subcutâneo de camundongos. Após 4 semanas, os animais foram eutanasiados e o tumor extraído para análise histológica. Para determinação da diferenciação celular, foi realizada a análise morfológica das células por meio da coloração de HE no grupo MT (16A). Em coloração marrom (16B), a marcação de endotélio. Para determinação da diferenciação celular no grupo MT, foi realizada a análise morfológica das células por meio da coloração de HE (16B). Observa-se uma possível formação de endotélio invadindo o tecido, presença de infiltrado inflamatório. Todas as fotos foram tiradas em uma escala  $\pm 100 \mu\text{m}$  e objetiva de 200x. Análise descritiva.

#### **4.6 Efeito do MT sobre a densidade microvascular com marcação de endotélio em modelo murino de tumor de bexiga**

Para avaliação da densidade capilar, um modelo murino de CB foi usado. Utilizou-se imuno-histoquímica para CD31 para identificação de células endoteliais. Conforme demonstrado graficamente na figura abaixo, foi possível marcarmos e quantificarmos as células endoteliais de vasos formados nos tumores. Animais tratados com 1-MT (inibidor da IDO) tiveram um aumento significativo na marcação de endotélio no tumor. Contagem realizada em 10 campos/grupo.



**Figura 17.** Imuno-histoquímica para CD31 em tumor de bexiga. Células MB49 foram inoculadas no subcutâneo de camundongos. Após 4 semanas, os animais foram eutanasiados e o tumor extraído. A densidade de capilares através da marcação de endotélio foi aumentada com o tratamento com 1-MT. \*  $p < 0,05$ .

## 5. Discussão

Ao iniciarmos a discussão, é preciso uma breve recapitulação. O objetivo primário dessa pesquisa foi verificar se a situação de hipóxia com alteração de HIF-1 $\alpha$  altera a expressão de INF $\gamma$  e IDO1 e se a atividade da IDO1 influencia direta ou indiretamente a angiogênese no CB, uma vez que sabemos que a angiogênese é processo finamente regulado, essencial em condições fisiopatológicas e que no CB ela contribui de alguma maneira para a progressão dele.

O fato de a progressão tumoral ser dependente da angiogênese, estimulou pesquisas nesta área em alguns tumores e no CB não foi diferente, pois é uma causa importante de mortalidade e incidência entre as neoplasias do sistema urinário<sup>2</sup>.

Como nosso grupo estuda há alguns anos o CB com hipótese de que a IDO funciona como um biomarcador da doença e como alvo terapêutico, decidimos partir para

a angiogênese, um cenário específico dentro do CB onde ainda não há conclusões de que a IDO atue, o que seria de grande valia ser estudado.

Embora conflitantes, vimos que alguns estudos apontavam a expressão e atividade da IDO em angiogênese de tumores renais<sup>55</sup>, ovário<sup>57</sup>, cérebro<sup>56</sup> e pulmão<sup>58</sup>, contudo em CB os resultados não estavam confirmados. Isso nos abriu a possibilidade para o presente estudo, pois sabíamos da importância da angiogênese com dados mais concretos.

Sendo assim, o estudo foi dividido em duas partes: *in vitro* e *in vivo*. A primeira (*in vitro*) foi em simulação de hipóxia, pois ela atua na indução de angiogênese. Para o estudo *in vitro* foi importante saber que na célula tumoral a diminuição da concentração de oxigênio pode desenvolver: a apoptose, angiogênese tumoral, diferenciação celular e necrose<sup>70</sup>. Além disso, a hipóxia pode induzir alterações proteômicas que permitem que as células tumorais se adaptem superando a privação de oxigênio e/ou nutrientes, sobrevivendo e escapando do ambiente local hostil. Essa adaptação é acompanhada principalmente de angiogênese<sup>71</sup>.

Estudamos o CB na hipóxia justamente por ela ser importante condição que promove a alteração das células tumorais e o desenvolvimento vascular dos tumores sólidos<sup>72</sup>.

O primeiro resultado *in vitro* foi analisar a expressão de HIF-1 $\alpha$  no ambiente de hipóxia e observamos um aumento significativo em 1 hora de hipóxia quando comparado aos grupos controle e CoCl<sub>2</sub> (estabilizador de HIF-1 $\alpha$  já era o esperado) e um aumento significativo de forma tempo-dependente, ou seja, quanto mais tempo de hipóxia, maior a concentração de HIF-1 $\alpha$  intracelular.

No entanto, constatou-se no presente estudo um aumento em HIF-1 $\alpha$ , resultado previsto baseando-se no fato que o estresse causado pela hipóxia regula a expressão e ação do HIF-1 $\alpha$ , importante para adaptação celular<sup>73</sup>.

Um estudo analisou a importância disso no CB, por meio de imuno-histoquímica de 20 amostras de tecidos de CB emparelhados, além de amostras não tumorais, demonstrou uma expressão 5 vezes mais elevada de HIF-1 $\alpha$  no tecido tumoral<sup>74</sup>, corroborando outro estudo<sup>75</sup>, que analisou 79 amostras de CUB e 11 de bexigas normais, uma maior expressão no CUB, sendo que mais da metade testou positivo, principalmente nos invasivos e metastáticos<sup>74</sup>.

A expressão desse fator também foi correlacionada com o tamanho do CAP e, dessa forma, tumores ortotópicos e subcutâneos constituídos por células com superexpressão de HIF 1 $\alpha$  tiveram um tamanho 3 vezes maiores<sup>76</sup>.

Por ter um papel fundamental no mecanismo de metástase em outras neoplasias malignas, a inibição de HIF-1 $\alpha$  e HIF 2 em um modelo *in vivo* de melanoma não afetou o desenvolvimento do tumor primário, porém houve inibição da metástase tumoral<sup>77</sup>. Isso corrobora o nosso estudo a qual o HIF-1 $\alpha$  diminuiu na presença do Cocl2 e, com isso, apoiamos a ideia de que a baixa expressão da IDO1 pode estar sendo influenciada pelo HIF-1 $\alpha$ .

O Anaerogen foi eficaz em aumentar o HIF-1 $\alpha$  (confirmando hipóxia) de uma maneira tempo-dependente, atingindo 48 horas de hipóxia *in vitro*. Quando analisamos a REC, observamos diminuição na expressão de HIF-1 $\alpha$ , porém não semelhante ao grupo controle.

Em outro experimento *in vitro*, avaliamos o IFN  $\gamma$ , e observamos um aumento progressivo de acordo os tempos de hipóxia quando comparado a IDO1, isso leva a um

microambiente de maior inflamação. Mesmo na vigência do IFN  $\gamma$ , que é um potente indutor de IDO, a expressão e atividade da IDO diminuiu no nosso estudo. A análise do IFN  $\gamma$  é de fundamental importância quando queremos analisar a expressão e atividade de IDO<sup>47</sup>. A REC, levou a uma queda do IFN  $\gamma$ , e se expressou semelhante a 1h de hipóxia.

Outra análise *in vitro* nos permitiu analisarmos a expressão proteica da IDO que não foi alterada pela hipóxia. No entanto, essa expressão pode ser correlacionada com a expressão basal de HIF-1 $\alpha$ .

Observamos que a expressão de IDO foi menor em tempos de hipóxia e incubação com CoCl<sub>2</sub>, expressão maior em 48 horas quando comparado ao grupo CoCl<sub>2</sub>. No início do estudo, a expectativa era que, quando a hipóxia fosse recuperada houvesse uma explosão de L-quinurenina e esse fenômeno auxiliaria na formação de novos vasos, por isso realizamos o estudo de recuperação de hipóxia com 24h, e nossos resultados demonstraram que em 24 horas de REC houve recuperação embora não totalmente, talvez pelo fato do aumento de HIF1 -1 $\alpha$  modular negativamente a IDO1.

Ao estudarmos a atividade da IDO1 (L-quinurenina), confirmamos sua dependência de oxigênio em situação de hipóxia, pois apresentou-se diminuída em tempos de hipóxia. Embora os resultados de IDO1 no presente estudo mostrem que ela diminuiu em hipóxia, a comparação da expressão de IDO1 no CB e nos tecidos normais de bexiga por outro estudo demonstrou uma maior expressão, principalmente em relação ao grau histológico e estágio TMN, sobretudo nos classificados como de alto grau e estágio T2-T4, respectivamente<sup>78</sup>.

Relacionando esses dois primeiros achados do trabalho, poucos estudos apresentaram a relação de HIF-1 $\alpha$  com IDO. O mais recente demonstrou que em células

humanas nocauteadas para HIF-1 $\alpha$ , a replicação de citomegalovírus foi aumentada por conta do aumento da expressão de IDO1<sup>79</sup>, mostrando que, de uma forma indireta, o HIF1 $\alpha$  interfere na IDO. Outro estudo demonstrou que a hipóxia diminuiu significativamente a expressão de IDO1 e intensificou a apoptose de células neoplásicas incubadas com linfócitos T citotóxicos e células NK<sup>65</sup>.

Na REC, houve diminuição de IDO, não semelhante ao grupo Controle, mas essa diminuição de IDO foi recuperada. Por isso, houve necessidade de verificar se a recuperação da hipóxia das células T24 seria capaz de afetar a expressão e atividade IDO1, uma vez que sua atividade estava reduzida na hipóxia avaliada pela medição de L-quinurenina no meio de cultura. Entretanto, supõe-se que tal fato seja devido a necessidade de oxigênio que catalisa a clivagem oxidativa do anel indol do triptofano. Dessa forma, o ambiente com baixa concentração de O<sub>2</sub> poderia diminuir sua atividade catalítica<sup>80</sup>.

Foi importante analisar se a L-quinurenina é capaz ou não de influenciar a angiogênese e, no estudo, os resultados apresentaram diminuição da expressão de IDO e L-quinurenina em tempos de hipóxia e com incubação com CoCl<sub>2</sub>, sendo que na REC a L-quinurenina aumentou significativamente e esses resultados indicaram que a hipóxia induz HIF-1 $\alpha$  e induz angiogênese. Contudo, em contrapartida, ela aumenta o processo inflamatório. Talvez seja por esse motivo que a expressão de IDO foi diminuída e os efeitos do sistema imune presente aumentaram, como confirmamos nos experimentos em animal, o que nos levou a crença de que a hipóxia aumenta o processo inflamatório local, além de induzir angiogênese.

Nosso resultado pode ser comparado com casos de carcinoma ductal invasivo que apresentou um alto infiltrado inflamatório, trazendo para o local uma grande quantidade de células imunológicas<sup>81</sup>, principalmente na região do estroma tumoral em que a IDO1 foi altamente expressa. A expressão de IDO1 na região de estroma pode estar relacionada à presença de grande quantidade de células imunológicas, pois a enzima atuaria nessas células, diminuindo a resposta imunológica pela depleção local do triptofano<sup>82</sup>, favorecendo o desenvolvimento do tumor intensificando a inflamação.

Pacientes com CB que possuem uma maior expressão de IDO1 apresentam uma maior progressão tumoral, quando comparado com tumores IDO1 negativos. Associado a isso, também ocorre a diminuição na concentração de triptofano na urina dos pacientes com carcinoma urotelial de bexiga (CUB), em comparação com outras alterações benignas, considerando o papel da IDO1 no catabolismo desse aminoácido<sup>83</sup>.

Como essa enzima possui uma relação significativa com o tamanho tumoral, evidenciaram que o *knockdown* de IDO1 reduz a proliferação de linhagens celulares do CB, como as células T24 utilizadas em nosso estudo, acompanhado pela redução da angiogênese *in vitro* de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs)<sup>84</sup>.

Alterações na expressão de micro RNA, como o miRNA-153, expresso de forma reduzida nas células T24, também podem estar ligadas com esses mecanismos. Esse demonstrou atuar no controle da expressão de IDO1, reduzindo angiogênese *in vitro* de HUVECs e *in vivo* no ensaio de membrana corioalantóica (CAM), salientado o papel da IDO1 na promoção de vascularização tumoral<sup>85</sup>.

A angiogênese vinculada a IDO1 parece estar relacionada com a via de sinalização IL6/STAT3/VEGF<sup>85</sup>, de maneira que a superexpressão de IDO1 nas células

trofoblásticas são importantes no processo de embriogênese e semelhantes as células tumorais em aspectos proliferativos e invasivos.

Estudos mostraram regular positivamente níveis de STAT3 fosforilado (pSTAT3), o qual também é capaz de reverter a diminuição da proliferação e migração dessas mesmas células causadas pelo *knockdown* IDO<sup>86</sup>.

Assim como a super expressão de miRNA-153 ou uso 1-MT em células T24, a IDO ocasionou a redução da expressão de interleucina-6 (IL-6), além de diminuição da pSTAT3 e expressão de VEGF, um importante fator na angiogênese<sup>85</sup>.

Em geral, quando as células de câncer são expostas à hipóxia, situação comum em tumores no qual o crescimento exacerbado e a intensa atividade metabólica criam um rápido consumo de oxigênio, as células em hipóxia produzem VEGF-A, um potente indutor da angiogênese. Se a IDO está envolvida na angiogênese tumoral, é possível que IDO possa atuar através do VEGF-A.

Neste estudo, foi utilizado um método para induzir a hipóxia em células T24 de carcinoma de bexiga humana, a fim de analisar o efeito de inibição da IDO sobre a expressão do VEGF-A e acredita-se que estejam envolvidos com a patogênese tumoral do CB<sup>73,87</sup>.

Ainda *in vitro*, nossos resultados sobre a expressão de VEGF-A e IDO1 (figura 14), apresentou aumento de VEGF-A progressivamente com o tempo de hipóxia. Já a expressão de IDO1 diminuiu significativamente com a hipóxia, também de maneira tempo dependente. O que nos leva a acreditar é que a inibição da IDO atue na produção da angiogênese. A expressão de VEGF-A correlacionou-se negativamente com a expressão de IDO1.

Assim como o HIF-1 $\alpha$ , o VEGF pode tornar-se uma ferramenta primordial para o prognóstico, uma vez que o nível sérico foi associado significativamente com o estágio e grau do tumor com uma concentração maior durante a invasão e metástase<sup>88</sup>.

No CUB, por exemplo, 62,5% de 296 amostras apresentaram resultados positivos para VEGF<sup>89</sup>. Além disso, um ensaio realizado com células T24, apontou o aumento do mRNA e proteína de HIF-1a e de outras proteínas relacionadas como VEGF quando submetidas a hipóxia<sup>90</sup>.

Jones e colaboradores demonstraram que células T24 expostas a hipóxia tinham aumento na expressão do VEGF-A após 16 horas de hipóxia. Desse modo, em análises anteriores, células T24 em hipóxia tiveram a expressão de VEGF-A aumentado em relação ao tempo. Em contrapartida, não houve o aumento do mRNA de HIF-1 $\alpha$ , porém os autores supuseram que esse acréscimo ocorreu devido a diminuição da sua degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma<sup>66</sup>.

Consequentemente, a superexpressão de VEGF resultou em brotamento vascular e hiperfunção associada a formação de brotos angiogênicos pela promoção da migração e proliferação das células endoteliais, o que explicaria parte dos mecanismos angiogênicos tumorais do CB<sup>91</sup>.

Outra proteína, o Foxp3, da família *forkhead box*, importante na regulação da função das células T regulatórias que, já correlacionado com aIDO, associou-se com a expressão de VEGF-C, indicando que além de HIF-1 $\alpha$ , outras vias e proteínas podem estar relacionadas com a indução de VEGF<sup>92</sup>.

Avaliamos a angiogênese *in vitro*, realizando a contagem de tubos vasculares formados por células HUVEC e, no intuito de avaliar o papel daIDO1 sobre a formação de tubos vasculares, a situação de aumento de L-quinurenina e/ou depleção de triptofano

foi promovida. Esse experimento permitiu observar que tanto o aumento de L-quinurenina como a queda de triptofano no meio de cultura promoveram diminuição significativa na formação de tubos vasculares e quando o aumento de L-quinurenina foi associado a diminuição de triptofano, o efeito inibitório de formação de tubos vasculares foi potencializado. Mais uma confirmação de que a diminuição da atividade de IDO possa estar relacionada a formação da angiogênese ao observar a sensibilidade da célula HUVEC a ausência de triptofano.

A segunda parte do presente estudo foi *in vivo*, realizado em modelo ectópico porque é mais adequado na visualização e análise de endotélio, além do estudo do próprio tumor ficar mais consistente.

O grupo já realizou estudo em modelo ortotópico, porém esse modelo apresentou um tumor muito variável, até mesmo com necrose. Por isso, repetir o mesmo modelo, dificultaria a análise dele.

Os critérios necessários para quantificação destes processos, tais como: escolha do local no tumor a ser quantificada a angiogênese, o marcador imuno-histoquímica e o método de quantificação a serem empregados são questões importantes as quais foram discutidas no início do estudo.

Ao se adicionar o 1-metil-DL-triptofano às culturas, observou-se a inibição da IDO<sup>93,94</sup>. Sabendo que tal composto é um inibidor competitivo da enzima<sup>62</sup>, capaz de diminuir significativamente a expressão dela, partimos para o tratamento de animais com o MT e verificamos um aumento de endotélio (utilizando anticorpo AntiCD31) quando comparado ao grupo controle, conforme a apresentação do gráfico (figura 17), indicando um papel da IDO na angiogênese do CB corroborando os resultados *in vitro*.

Resultados do nosso grupo demonstraram que a expressão de IDO1 diminuiu no *front* tumoral no mesmo modelo ectópico e também no ortotópico. Não descartamos a hipótese de que a queda da IDO1 se relacione à aquisição de um fenótipo mais invasivo, o que aumentaria o poder metastático (artigo submetido e revisado para a revista *International Journal of tryptophan research*).

O presente estudo mostrou que em tempos específicos de hipóxia há aumento de HIF-1 $\alpha$  e IFN  $\gamma$ . Em contrapartida, há diminuição de IDO1 e sua atividade. Já VEGF e IDO apresentaram correlação negativa uma vez que VEGF apresentou mais elevado quando comparado a IDO e esse fenômeno foi confirmado não só *in vitro*, mas também *in vivo* quando observamos aumento de tubos vasculares e marcação endotelial, respectivamente. No retorno de 24 horas, IDO1 e sua atividade aumentaram, embora não recuperadas totalmente.

Dessa maneira, o estudo continuará sendo realizado, pois abriu as possibilidades para pesquisas entre hipóxia e IDO na angiogênese do CB. Testes complementares ainda serão realizados, porém os resultados obtidos até o momento corroboram nossa hipótese secundária de que há modulação de HIF-1 $\alpha$  na IDO em angiogênese de câncer de bexiga

## 6. Conclusões

- Na situação de hipóxia, há diminuição da expressão de IDO1, bem como sua atividade, mesmo havendo aumento de IFN- $\gamma$ , um potente indutor de IDO1. Por conta da incubação com CoCl<sub>2</sub> oferecer o mesmo efeito sobre a IDO1, é possível que a inibição da IDO1 seja mediada pelo HIF-1 $\alpha$ ;

- A situação de queda de triptofano e aumento de L-quinurenina diminui a formação de vasos *in vitro*, sugerindo que a queda da IDO1 durante a hipóxia favoreça a angiogênese no CB;
- O uso de MT em modelo animal aumenta a angiogênese, corroborando os resultados *in vitro*.

## 7. Referências bibliográficas

1. Who. Who report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. Geneva: world health organization, 2020. 149 p. ISBN 978-92-4-000129-9.
2. Inca. Estimativa 2020: incidência de câncer no brasil. Rio de janeiro: 2019. 120 p. ISBN 978-85-7318-389-4.
3. Van kessel KE, et al. Targeted therapies in bladder cancer: an overview of in vivo research. *Nat rev urol* 12, 2015, 681–694
4. Kamat, AM, et al. Bladder cancer. *The lancet*, v. 388, n.10061, p. 2796–2810, jun. 2016
5. Flaig, Thomas w et al. Nccn guidelines insights: bladder cancer. *Journal of the national comprehensive cancer network: Jncn*, v. 16, n. 9, p. 1041-1053, set. 2018.
6. Sanli, O.; et al. Bladder cancer. *Nature reviews -disease primers*, v. 3, n. 17022, 2017.
7. Anderson, Beverley. Bladder cancer: overview and disease management: part 1: non-muscle-invasive bladder cancer. *British journal of nursing*, [s. l.], v. 27, ed. 9, p. s27-s37, 11 maio 2018.
8. Hanahan, D.; Weinberg, RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646-74, mar 4, 2011. ISSN 1097-4172
9. Mesri EA, Feitelson MA, Munger K. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe*. 2014 Mar 12;15(3):266-82.

10. Gavalas, NG. Et al. Angiogenesis-related pathways in the pathogenesis of ovarian cancer. *Int J Mol SCI*, 2013; v. 14, n. 8, p. 15885-909.
11. Liu, a. Y.; Ouyang, G. Tumor angiogenesis: a new source of pericytes. *Curr biol*, jul 8 2013; v. 23, n. 13, p. R565-8
12. Satoshi, Inoue, et al. Role of the androgen receptor in urothelial câncer. *Molecular and cellular endocrinology* 465 (2018) 73-81
  
13. Semenza GL, Wang gl. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol cell biol*. 1992 dec;12(12):5447-54.
14. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxiainducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996;16(9):4604-13
15. Epstein AC, et al. Elegans egl-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate hif by prolyl hydroxylation. *Cell*. 2001 oct 5;107(1):43-54.
16. Hirsilä M, et al. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J biol chem*. 2003 aug 15;278(33):30772-80.
17. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (hif-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J biol chem*. 1997 sep 5;272(36):22642-7
18. Hon WC, et al. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in hif-1 alpha by pvhl. *Nature*. 2002 jun 27;417(6892):975-8. Epub 2002 jun 5. Pmid: 12050673.
19. Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science*. 1988 dec 9;242(4884):1412-5.
20. Hou, M, et al. O papel pró-angiogênico do estabilizador do fator indutível por hipóxia fg-4592 e sua aplicação em um modelo de câmara de engenharia de tecidos in vivo. *SCI rep* 9, 6035 (2019).
21. Blanco r, Gerhardt H. Vegf and notch in tip and stalk cell selectin. *Cold spring harbor perspectives medicine*. 2013. 3(1): a006569.
22. Semenza, GL. Hif-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends mol med*, 2002; v. 8, n. 4 suppl, p. S62-7.

23. Coulon, S. Et al. Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. *Liver int*, v. 31, n. 2, p. 146-62, feb 2011. Issn 1478-3231
24. Penton, andrea I et al. "Notch signaling in human development and disease." *Seminars in cell & developmental biology* vol. 23,4 (2012): 450-7.
25. Garcia A, kandel JJ. Notch: a key regulator of tumor angiogenesis and metastasis . *Histology and histopathology*. 2012. 27(2):151-156.
26. Aste-Amézaga, Miguel et al. "Characterization of Notch1 antibodies that inhibit signaling of both normal and mutated Notch1 receptors." *PloS one* vol. 5,2 e9094. 8 Feb. 2010.
27. Hellstrom, M., et al. Dll4 signalling through notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*. 2007, 445, 776–780.
28. Qutub, AA., and Popel, AS. Elongation, proliferation & migration differentiate endothelial cell phenotypes and determine capillary sprouting. *BMC SYST. Biol*. 2009. 3, 13.
29. [Lucio Miele \(2008\) direcionamento racional da sinalização de Notch no câncer de mama, Expert Review of Anticancer Therapy, 8: 8, 1197-1202.](#)
30. Prathibha ranganathan\_et al. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nature reviews cancer* volume11, pages338– 351 (2011)
31. Weis, SM.; Cheresch, DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat med*, 2011; v. 17, n. 11, p. 1359-70.
32. Gacche RN, Meshram RJ. Targeting tumor micro-environment for design and development of novel anti-angiogenic agents arresting tumor growth. *Prog biophys mol biol*. 2013 nov;113(2):333-54.
33. Theodoropoulos GE, et al. Evaluation of hypoxia-inducible factor 1alpha overexpression as a predictor of tumour recurrence and progression in superficial urothelial bladder carcinoma. *BJU INT*. 2005 feb;95(3):425-31.

34. Chai CY, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression correlates with focal macrophage infiltration, angiogenesis, and unfavourable prognosis in urothelial carcinoma. *J clin pathol.* 2008 may;61(5):658-64.
35. Deniz H, Karakök M, Yagci F, Güldür ME. Evaluation of relationship between hif1alpha immunoreactivity and stage, grade, angiogenic profile and proliferative index in bladder urothelial carcinomas. *Int Urol Nephrol.* 2010 mar;42(1):103-7.
36. Chen CH, et al. Association between vegf gene promoter polymorphisms and bladder cancer: an updated meta-analysis. *Cytokine.* 2020 jul; 131:155112. Epub 2020 apr 29. Pmid: 32361400.
37. Kopparapu PK, et al. Expression of VEGF and its receptors vegfr1/vegfr2 is associated with invasiveness of bladder cancer. *Anticancer res.* 2013 jun;33(6):2381-90.
38. Mazzola CR, Chin J. Targeting the vegf pathway in metastatic bladder cancer. *Expert opin investig drugs.* 2015;24(7):913-27.
39. Sugimoto H, et al. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of o2 incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proc natl acad sci u s a.* 2006 feb 21;103(8):2611-6.
40. Terentis ac, et al. The heme environment of recombinant human indoleamine 2,3dioxygenase. Structural properties and substrate-ligand interactions. *J biol chem.* 2002 May 3;277(18):15788-94.
41. Sono M, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Equilibrium studies of the tryptophan binding to the ferric, ferrous, and co-bound enzymes. *J biol chem.* 1980 feb 25;255(4):1339-45.
42. Metz R, et al. Novel tryptophan catabolic enzyme ido2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound d-1methyl-tryptophan. *Cancer res.* 2007 aug 1;67(15):7082-7.
43. Higuchi K, Hayaishi O. Enzymic formation of d-kynurenine from d-tryptophan. *Arch biochem biophys.* 1967 may;120(2):397-403.

44. Yamamoto S, Hayaishi O. Tryptophan pyrrolase of rabbit intestine. D- and ltryptophan-cleaving enzyme or enzymes. *J Biol Chem.* 1967 Nov 25;242(22):5260-6.
45. Mackenzie CR, et al. 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.
46. Terness P, Bauer TM, Röse L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: Mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med.* 2002;196(4):447-57.
47. Munn DH, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science.* Aug 21, 1998;281(5380):1191-3.
48. Platten M, et al. Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion. *Platten Cancer Res.* 2012 Nov 1;72(21):5435-40.
49. Uyttenhove C, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med.* 2003 Oct;9(10):1269-74.
50. Takikawa O, Kuroiwa T, Yamazaki F, Kido R. Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. *J Biol Chem.* 1988 Feb 5;263(4):2041-8.
51. Denardo DG, Andreu P, Coussens IM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 2010 Jun;29(2):309-16.
52. Poch, M., et al. Expansion of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) from bladder cancer. *Oncoimmunology*, 2018, 7(9), e1476816.
53. Moreau, M., et al. Bacille Calmette-Guérin inoculation induces chronic activation of peripheral and brain indoleamine 2,3-dioxygenase in mice. *The Journal of Infectious Diseases*, 192(3), 537-544.
54. Litzénburger UM, Opitz CA, Sahm F, et al. Constitutive IDO expression in human cancer is sustained by an autocrine signaling loop involving IL-6, STAT3 and the AHR. *Oncotarget.* 2014;5(4):1038-1051.

55. 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.* Dec 1, 2007;13(23):6993- 7002.
56. Batista CE, et al. Imaging correlates of differential expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human brain tumors. *Mol Imaging Biol.* Dec 2009;11(6):460-6.
57. Nonaka H, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase promotes peritoneal dissemination of ovarian cancer through inhibition of natural killer cell function and angiogenesis promotion. *Int j oncol.* 2011 jan;38(1):113-20.
58. Mondal A, et al. IDO1 is an integral mediator of inflammatory neovascularization. *Ebiomedicine.* 2016 dec; 14:74-82. Epub 2016 nov 9.
59. Pan J, et al. Gene silencing of indoleamine 2,3-dioxygenase hinders tumor growth through angiogenesis inhibition. *Int j oncol.* 2017 jun;50(6):2136-2144.
60. Yang C, et al. 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.
61. Zhang W, et al. MicroRNA-153 decreases tryptophan catabolism and inhibits angiogenesis in bladder cancer by targeting indoleamine 2,3-dioxygenase 1. *Front oncol.* 2019 jul 10; 9:619.
62. Schmidt SK, et al. Regulation of ido activity by oxygen supply: inhibitory effects on antimicrobial and immunoregulatory functions. *Plos one.* 2013;8(5): e63301. Published 2013 May 13.
63. Herbert A, et al. Hypoxia regulates the production and activity of glucose transporter1 and indoleamine 2,3-dioxygenase in monocyte-derived endothelial-like cells: possible relevance to infantile haemangioma pathogenesis. *British j of dermatology* 2011, 164: 308–315.
64. Platten M, Nollen EAA, Röhrig UF, Fallarino F, Opitz CA. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2019 May;18(5):379-401.
65. Liu J, Zhang H, Jia L e Sun H. Efeitos das células treg e IDO em células de câncer epitelial de ovário humano em condições de hipóxia. *Mol med rep* 11: 1708-1714, 2015

66. Cesário JM, et al. A simple method to induce hypoxia-induced vascular endothelial growth factor-a (vegf-a) expression in t24 human bladder cancer cells. *In vitro cell dev biol anim.* 2017 mar;53(3):272-276. Epub 2016 oct 17.
67. Chen F, Zhang G, Cao Y, Hessner MJ, See WA. MB49 murine urothelial carcinoma: molecular and phenotypic comparison to human cell lines as a model of the direct tumor response to bacillus Calmette-Guerin. *J Urol.* 2009 Dec;182(6):2932-7.
68. Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang AG. Statistical power analyses using G\*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods.* 2009 Nov;41(4):1149-60.
69. Jia I, et al. Toxicology and pharmacokinetics of 1-methyl-d-tryptophan: absence of toxicity due to saturating absorption. *Food chem toxicol.* 2008 jan;46(1):203-11.
70. Papandreou, Ioanna et al. A anoxia é necessária para a toxicidade das células tumorais causada por um ambiente com baixo teor de oxigênio. *Pesquisa do câncer,* v. 65, n. 8, pág. 3171-3178, 2005.
71. Vaupel, P.; Harrison, I. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *The oncologist,* v. 9, n. S5, p. 4-9, nov. 2004.
72. Axelson, H et al. Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells—a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. in *seminars in cell & developmental biology.* Academic press, 2005. p. 554-563.
73. Al tameemi, W.; Dale, T. P.; Al-Jumaily, R.; Forsyth, N. R. Hypoxia-modified cancer cell metabolism. *Front cell dev biol,* v. 7, n. 4, jan. 2019.
74. Yang et al. Hypoxia-induced Autophagy Promotes Gemcitabine Resistance in Human Bladder Cancer Cells Through Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  Activation. *International Journal of Oncology,* v. 53, n. 1, p. 215-224, abr. 2018.
75. Zhu, J.; et al. Hif-1 $\alpha$  promotes zeb1 expression and emt in a human bladder cancer lung metastasis animal model. *Oncology letters,* v. 15, n. 3, p. 3482–3489, mar. 2018.
76. Luo M, Brooks M, Wicha MS. Asparagine and Glutamine: Co-conspirators Fueling Metastasis. *Cell Metab.* 2018 May 1;27(5):947-949.
77. Hanna, SC, et al. Hif1 $\alpha$  and hif2 $\alpha$  independently activate SRC to promote melanoma metastases. *The journal of clinical investigation,* v. 123, n. 5, p. 2078–2093, 2013

78. Yang C, et al. 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.
79. Wise IM, Xi Y, Purdy JG. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (hif1 $\alpha$ ) suppresses virus replication in human cytomegalovirus infection by limiting kynurenine synthesis. *Mbio*. 2021;12(2): e02956-20.
80. Dang, Y.; dale, W. E.; brown, O R. Comparative effects of oxygen on indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase of the kynurenine pathway. *Free radical biology & medicine*, v. 28, n. 4, p. 615–624, fev. 2000
81. Carvalho, MA.; Pires, I.; Prada,J.; Queiroga, L.F. Role for t-lymphocytes in human breast cancer and in canine mammary tumors. *Biomed research international*. V. 2014, p.1-11, 2014.
82. Zamanakou, M.; Germeneis, EA.; Karanikas, V. Tumor immune escape mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunology letters*. V.111, p.69-75, 2007.
83. Tsai Y. S.; Jou YC.; Tsai H. T.; Cheong IS.; Tzai TS. Indoleamine-2,3-dioxygenase1 expression predicts poorer survival and up-regulates zeb2 expression in human early-stage bladder cancer. *Urologic oncology*, v. 37, n. 1, p. 810.e17-810.e27, jun. 2019.
84. Zhang W, et al. Microrna-153 decreases tryptophan catabolism and inhibits angiogenesis in bladder cancer by targeting indoleamine 2,3-dioxygenase 1. *Front oncol*. 2019 jul 10; 9:619.
85. Zhang, W.; et al. 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*, v. 12, n. 3, p. 485–492, mar. 2019.
86. Zong, S, et al. Dysregulated expression of ido may cause unexplained recurrent spontaneous abortion through suppression of trophoblast cell proliferation and migration. *Scientific reports*, v. 6, n. 19916, jan. 2016.
87. Huang, D.; Li, C.; Zhang, H. Hypoxia, and cancer cell metabolism. *Acta biochimica et biophysica sinica*, v. 46, n. 3, p. 214–219, mar. 2014
88. Bernardini, S.; et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor as a prognostic factor in bladder cancer. *The journal of urology*, v. 166, n. 4, p. 1275–1279, out. 2001

89. Geng, J, et al Decreased reg1 $\alpha$  expression suppresses growth, invasion, and angiogenesis of bladder cancer. *European society of surgical oncology*, v. 43, n. 4, p. 837–846, fev. 2017.
90. Li, y, et al. Effects of yc-1 on hypoxia-inducible factor 1 alpha in hypoxic human bladder transitional carcinoma cell line t24 cells. *Urologia internationalis*, v. 88, n. 1, p. 95-101, 2012
91. Gerhardt, H, et al. Vegf guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The journal of cell biology*, v. 161, n. 6, p. 1163–1177, jun. 2003
92. Tang, J, et al. Foxp3 is correlated with vegf-c expression and lymphangiogenesis in cervical cancer. *World journal of surgical oncology*, v. 15, n. 1, p. 173, set. 2017.
  
93. 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.
94. WANG, Y.; et al. IDO(+) DCs and signalling pathways. *Curr Cancer Drug Targets*. v.13, p.278-288, 2013.