

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “*STRICTO SENSU*” EM MEDICINA**

JONAS MAGNO DOS SANTOS CESÁRIO

**“EXPRESSÃO DE INDOLEAMINA 2,3 DIOXIGENASE (IDO) EM CÉLULAS T24 DE
CARCINOMA DE BEXIGA URINÁRIA SUBMETIDAS À HIPÓXIA: CORRELAÇÃO
COM FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)”**

SÃO PAULO

2015

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “*STRICTO SENSU*” EM MEDICINA**

JONAS MAGNO DOS SANTOS CESÁRIO

**“EXPRESSÃO DE INDOLEAMINA 2,3 DIOXIGENASE (IDO) EM CÉLULAS T24 DE
CARCINOMA DE BEXIGA URINÁRIA SUBMETIDAS À HIPÓXIA: CORRELAÇÃO
COM FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)”**

Dissertação de mestrado
apresentada de Pós-Graduação em
Medicina da Universidade Nove de
Julho como requisito para obtenção
do título de Mestre.

Orientador: Prof. Humberto Dellê

Co-Orientador: Alex Kors Vidsiunas

SÃO PAULO

2015

Cesário, Jonas Magno dos Santos.

Expressão de Indoleamina 2,3 Dioxigenase (IDO) em células T24 de carcinoma de bexiga urinária submetidas à hipóxia: correlação com fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)./ Jonas Magno dos Santos Cesário. 2015.

51 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2015.

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

1. Câncer de bexiga urinária. 2. Angiogênese. 3. Hipóxia. 4. Indoleamina 2,3-dioxigenase.

I. Dellê, Humberto.

II. Título

CDU 616

São Paulo, 03 de fevereiro de 2015.

TERMO DE APROVAÇÃO

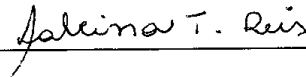
Aluno (a): JONAS MAGNO DOS SANTOS CESÁRIO

Título da Dissertação: "EXPRESSÃO DO INDOLEAMINA 2,3- DIOXIGENASE (IDO) EM CÉLULAS T24 DE CARCINOMA DE BEXIGA URINÁRIA SUBMETIDA À HIPOXIA: CORRELAÇÃO COM VEGF".

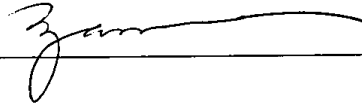
Presidente: PROF. DR. HUMBERTO DELLÉ



Membro: PROFA. DRA. SABRINA THALITA DOS REIS



Membro: PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER



SUMÁRIO

Resumo	
1. INTRODUÇÃO	5
1.1 Angiogênese no câncer	6
1.2 Papel da Indoleamina 2,3-Dioxigenase (IDO) no câncer	8
1.3 IDO na angiogênese	9
2 OBJETIVO	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Fase “ <i>in vitro</i> ”	13
3.1.1 Cultura de células	13
3.1.2 Indução de hipóxia	13
3.1.3 Extração de RNA	15
3.1.4 RT-PCR em tempo real	15
3.1.5 Ensaio de viabilidade celular para células HUVEC	17
3.2 Fase “ <i>in vivo</i> ”	19
3.2.1 Animais	19
3.2.2 Inoculação de células pela via subcapsular renal	19
3.2.3 Eutanásia e coleta de material	22
3.2.4 Imuno-histoquímica	22
3.2.5 Análise estatística	25
5 RESULTADOS	26
5.1 Fase “ <i>in vitro</i> ”	26
5.1.1 Indução de hipóxia em células T24	26
5.1.2 Expressão de VEGF	27
5.1.3 Expressão de HIF	28
5.1.4 Expressão de IDO	29
5.1.5 Correlação entre HIF e IDO	30
5.1.6 Efeito do MT sobre a expressão de VEGF	31
5.1.7 Viabilidade de células HUVEC tratadas com MT	32

5.2 Fase “ <i>in vivo</i> ”	33
5.2.1 Inoculação de células T24 no espaço subcapsular renal	33
5.2.2 Padronização de imuno-histoquímica para VEGF	34
5.2.3 Imuno-histoquímica para VEGF em células T24 inoculadas	35
5.2.4 Imuno-histoquímica para CD-31 em células T24 inoculadas	36
5.2.5 Imuno-histoquímica para α -SMA	37
5.2.6 Imuno-histoquímica paraIDO	38
5.2.7 Análise de tumores de células T24	39
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÕES	44
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

RESUMO

O câncer de bexiga urinária é a neoplasia maligna mais comum do sistema urinário e para seu crescimento e progressão, a angiogênese é necessária. A Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), uma molécula reconhecida por suas propriedades imunomoduladoras e surge como um potencial modulador da angiogênese. Sua expressão está associada com fatores pró-angiogênicos em tipos diferentes de câncer, porém no câncer de bexiga não foi ainda explorada.

O objetivo do presente estudo foi analisar a expressão de IDO em células T24 de carcinoma de bexiga urinária em situação de hipóxia, a fim de correlacioná-la com fatores de indução de angiogênese.

Células T24 foram submetidas à hipóxia através do produto AnaeroGen durante quatro períodos de incubação (1 h, 8 h, 24 h e 48 h). RT-PCR em tempo real foi realizada para análise da expressão de VEGF, HIF e IDO. Células sem hipóxia foram usadas como controle. Como segunda etapa, as células foram tratadas com o inibidor da IDO (1-metil triptofano) e submetidas ou não à hipóxia para a avaliação da expressão do VEGF. Adicionalmente, células HUVEC foram tratadas com o inibidor da IDO para avaliação da viabilidade celular. Na fase “*in vivo*”, camundongos Balb/c nude receberam células T24 sob a cápsula renal para o estabelecimento de um modelo que permitisse a avaliação de neovasos tumorais (30 dias). A caracterização dos neovasos foi feita por imunohistoquímica.

A expressão de VEGF aumentou significativamente ao longo dos períodos de incubação, sendo tempo-dependente. Já a expressão de HIF e IDO não sofreu alteração significativa. Entretanto, houve uma correlação positiva entre HIF e IDO (coeficiente de correlação 0,615, Spearman). O tratamento com inibidor da IDO diminuiu significativamente a expressão de VEGF em células T24 submetidas à hipóxia, além de diminuir a viabilidade de células HUVEC. A inoculação subcapsular renal de células T24 é um modelo interessante para o estudo da formação de novos vasos, porém animais tratados com inibidor da IDO não apresentaram formação de tumor subcapsular, apenas infiltrados que não permitiram a quantificação vascular.

O estudo conclui que a IDO correlaciona-se com fatores indutores de angiogênese na situação de hipóxia e sua inibição diminui a expressão de VEGF e a viabilidade de células endoteliais. A inibição da IDO pode ser uma alternativa promissora para inibir angiogênese em tumores de bexiga urinária.

Palavras-chave: câncer de bexiga urinária, angiogênese, hipóxia, indoleamina 2,3-dioxigenase, VEGF

ABSTRACT

The urinary bladder cancer is the most common malignancy of the urinary system and for his growth and progression, angiogenesis is necessary. A indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), a molecule known for its immunomodulatory properties arises as a potential modulator of angiogenesis. Its expression is associated with pro-angiogenic factors in different types of cancer, but in bladder cancer has not yet been explored.

The aim of this study was to analyze IDO expression in T24 cells of bladder carcinoma in situation of hypoxia in order to correlate it with angiogenesis-inducing factors.

T24 cells were subjected to hypoxia by AnaeroGen product during four periods of incubation (1 h, 8 h, 24 h and 48 h). Real time RT-PCR was performed to analyze the expression of VEGF, HIF and IDO. Cells without hypoxia were used as controls. As a second step, the cells were treated with the IDO inhibitor (1-methyl tryptophan) and subjected to hypoxia or not for the evaluation of VEGF expression. In addition, HUVEC cells were treated with the IDO inhibitor to assess cell viability. In "in vivo" step, Balb/c nude received T24 cells under the kidney capsule for the establishment of a model that would allow assessment of tumor neovasculature (30 days). The characterization of neovascularization was performed by immunohistochemistry.

The expression of VEGF was significantly increased over the incubation periods, and time-dependent. But the expression of HIF and IDO did not change significantly. However, there was a positive correlation between HIF and IDO (correlation coefficient 0.615, Spearman). Treatment with the IDO inhibitor significantly decreased VEGF expression in T24 cells subjected to hypoxia, in addition to reducing the viability of HUVEC cells. Renal subcapsular inoculation of T24 cells is an interesting model for the study of the formation of new vessels, but animals treated with IDO inhibitor did not shown formation of subcapsular tumor, only infiltrates that not allowed the vascular quantification.

The study concludes that IDO is correlated with factors that induce angiogenesis in hypoxic condition and its inhibition decreases the expression of VEGF and viability of endothelial cells. Inhibition of IDO may be a promising alternative for inhibiting angiogenesis in bladder tumors.

Keywords: bladder cancer, angiogenesis, hypoxia, indoleamine 2,3-dioxygenase, VEGF

1 INTRODUÇÃO

O câncer é responsável por cerca de 13% de todas as causas de óbito no mundo, sendo 8,2 milhões somente em 2012 ¹. Aproximadamente 30% das mortes por câncer podem ser associadas a cinco principais riscos comportamentais e nutricionais: índice de massa corporal elevado, baixa ingestão de frutas e legumes, falta de atividade física, tabagismo, uso de álcool ². Desses riscos, o mais importante é o uso do tabaco, que sozinho corresponde anualmente por cerca de 71% das mortes globais por câncer de pulmões ². Aproximadamente, 60% do total de casos novos anuais do mundo ocorrem na África, Ásia e nas Américas Central e do Sul ¹. Estas regiões também são responsáveis por 70% das mortes por câncer no mundo ².

Anualmente, o câncer mata cerca de 7 milhões de pessoas e este número poderá chegar a 15 milhões em 2020, pois morrem mais pessoas de câncer do que de HIV / SIDA, malária e tuberculose juntas e se nada for feito, este número poderá aumentar entre 70% a 82% nos países de baixa renda até 2030 ¹. No Brasil, no ano de 2014, estima-se 576 mil novos casos de câncer e deste total, 8.940 novos casos de câncer de bexiga (6.750 homens / 2.190 mulheres) ³. Nesse mesmo ano, o câncer de bexiga figura como a neoplasia urogenital mais frequente do homem após o câncer de próstata ³.

O câncer de bexiga urinária é a neoplasia maligna mais comum do sistema urinário ³⁷. Apesar da forma mais comum ser a não-invasiva muscular (70 % a 80 %),

30 % a 50% dos casos progridem para a forma invasiva após repetidas ressecções, forma esta responsável por alta mortalidade e metástase ³⁸.

1.1 Angiogênese no câncer

O termo angiogênese foi usado pela primeira vez em 1787 pelo cirurgião britânico Dr. John Hunter, em um estudo que descrevia o crescimento de novos vasos sanguíneos nos chifres de uma rena ⁴. O crescimento de novos vasos sanguíneos é um processo natural e importante que ocorre no corpo, porém um distúrbio neste processo pode dar origem a doenças dependentes da angiogênese, que resultam em crescimento excessivo ou insuficiente dos vasos sanguíneos ⁴.

A neovascularização é crítica para o crescimento de tumores e metástases, pois através da proliferação e migração das células endoteliais, o tumor receberá oxigenação e nutrientes para seu desenvolvimento ⁵. Em 1971, Folkman descreveu a importância da angiogênese para o crescimento do tumor. Desde então, muitos pesquisadores estudaram os mecanismos celulares e moleculares da angiogênese do tumor. Em um estudo recente, Jain e Carmeliet listaram os seis diferentes mecanismos da angiogênese tumoral: (1) surgimento da angiogênese; (2) vasculogênese; (3) cooptação vascular; (5) intussuscepção dos vasos; (6) mimetismo vasculogênico; e (6) diferenciação tumoral de células-tronco para células endoteliais ⁶.

As células tumorais, assim como células normais, possuem a habilidade de liberar indutores de angiogênese. No entanto, ao contrário das células normais, que

liberam baixos níveis destes indutores, as células tumorais liberam níveis elevados dos indutores angiogênicos, permitindo a proliferação tumoral ⁷.

Em condições de hipóxia, uma proteína chamada HIF (fator induzido por hipóxia, do inglês *hypoxia-inducible factor*) é ativada. Em células específicas, nessas condições, pode-se detectar o HIF-1 em níveis elevados, que induz tanto a transcrição, quanto a diminuição da degradação do mRNA do VEGF (fator de crescimento endotelial vascular, do inglês *vascular endothelial growth factor*) ⁸. Além de desempenhar um papel importante na ativação da expressão de VEGF, o HIF-1 faz a mediação das respostas homeostáticas à hipóxia e, por isso, células destituídas de HIF-1 não expressam VEGF sob essa condição ⁸.

Uma melhor compreensão das bases moleculares e celulares da normalização vascular pode levar a terapias mais eficazes contra o câncer. Por isso, diversos estudos de terapia anti-angiogênica têm sido publicados, estratégia esta que pode levar a diminuição da massa tumoral ⁹. Neste contexto, fármacos anti-VEGF têm sido utilizados para potencializar os efeitos dos agentes quimioterápicos, sugerindo uma melhora na estrutura e normalização da função dos vasos tumorais de câncer epitelial, peritoneal e tubas uterinas em estágio avançado ¹⁰.

Nos diversos tipos de câncer, a angiogênese se faz necessária para que a elevada demanda de oxigênio e nutrientes seja suprida. Sendo assim, em termos de terapia anti-câncer, o bloqueio da angiogênese torna-se atraente para a diminuição do crescimento tumoral, bem como sua disseminação.

1.2 Papel da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) no câncer

A IDO é uma molécula classicamente conhecida como imunomoduladora. O papel imunomodulador da IDO surgiu com os estudos experimentais desenvolvidos por Munn e colaboradores que demonstraram que existe um aumento significativo da expressão de IDO em células trofoblásticas e que a administração de metil-triptofano, um inibidor da IDO, causa rejeição do tecido embrionário em camundongos, mediada por linfócitos T alorreativos ¹¹. Em estudo subsequente, o mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que macrófagos cultivados “*in vitro*” expressando IDO inibem a proliferação de linfócitos T através da depleção de triptofano ¹².

Estudos mais recentes têm demonstrado que o efeito imunomodulador da IDO não se limita apenas à depleção de triptofano, mas também aos metabólitos que são gerados a partir deste aminoácido, mais especificamente os derivados da quinurenina. Terness e colaboradores demonstraram que células dendríticas expressando IDO inibem a proliferação de linfócitos T “*in vitro*” e a adição de derivados da quinurerina potencializa este efeito inibitório ¹³. Além de inibir a proliferação, os derivados da quinurenina induzem apoptose em linfócitos T “*in vitro*”, além de suprimirem timócitos alorreativos “*in vivo*” ¹⁴.

Os efeitos imunomoduladores da IDO são extremamente atraentes para a manutenção de um tecido que pode ser considerado como indesejável pelo sistema imunológico, ou seja, estes efeitos podem ser responsáveis pela manutenção e desenvolvimento tumoral. De fato, células neoplásicas podem expressar IDO e essa expressão correlaciona-se com a proteção do tumor contra o sistema imunológico ¹⁵.

Em experimento com camundongos pré-imunizados, a expressão de IDO protegeu células neoplásicas infundidas e esta proteção foi perdida a partir da inibição química da IDO com metil triptofano (MT) ¹⁵.

Um estudo com camundongo nocauteado para o gene Bin1, um gene supressor de tumor, demonstrou que a expressão de IDO é aumentada no tumor destes animais, sugerindo que a expressão de IDO nas células neoplásicas de glândula mamária está sob controle deste gene ¹⁶. A inibição da IDO potencializa o efeito de quimioterápicos contra estes tumores ¹⁶. Este efeito protetor da IDO em tumores é perdido quando se trata de camundongos nude (imunodeficientes) ou com depleção de células CD4+ e CD8+, demonstrando que há um fator protetor relacionado à imunomodulação ¹⁶. Curiosamente, a expressão de Bin1 é inibida em neoplasias humanas de diversos tecidos como mama, próstata, pulmões, cólon, sistema nervoso e pele ¹⁷⁻²¹, sugerindo a possível participação da IDO neste processo.

1.3 IDO na angiogênese

Certos mediadores possuem a capacidade de promover imunossupressão e angiogênese simultaneamente, e esta habilidade é fundamental no processo de desenvolvimento tumoral. Adquirir tolerância imunológica e conseguir suprir a enorme demanda de oxigênio e nutrientes é tudo que um tumor agressivo precisa para se instalar e disseminar. A IDO é uma candidata a esta função, pois inibe a ativação de células T através de esgotamento do triptofano e por meio da quinurenina, além de poder promover a formação do tubo endotelial e a angiogênese ²⁸. Duechler et al., demonstraram a correlação positiva de IDO e HIF em tumores de mama ²⁹. De fato, o

local onde a IDO foi consagrada por seu papel imunomodulador, na interface materno-fetal, há formação de neovasos com positividade para a IDO no endotélio ³⁰.

Um dos mecanismos da IDO em mediar a angiogênese pode estar relacionado ao VEGF. Em um estudo com 17 pacientes portadores de adenocarcinoma esofágico, com tumores classificados como positivos para a IDO, demonstrou aumento na expressão do VEGF em 81% dos casos, em contraste com tecidos normais, em que não houve expressão significativa deste fator ³¹.

Ritter et al., trabalhando com pacientes com hemangioma, demonstrou que as formas proliferativas do tumor possuem expressão marcante de IDO, diferente das formas não proliferativas, sugerindo o envolvimento da molécula na proliferação de células endoteliais ³². Além disso, células endoteliais submetidas à hipóxia aumentam a produção de IDO ³³.

Além disso, estudos demonstram que a expressão de IDO está presente em vasos sanguíneos de tumores renais ³⁴ e cerebrais ³⁵, apontando para um papel na fisiopatologia vascular tumoral.

O composto SU5416 é um agente anticancerígeno, ainda em fase experimental, demonstrou que ao inibir o VEGF-R2, ocorreu um aumento da expressão de IDO ³⁶.

Embora o papel da IDO na angiogênese tumoral não esteja esclarecido, há evidências de que esta molécula participe de alguma forma induzindo a formação vascular. Em tumor de bexiga urinária, não há estudo demonstrando esta correlação. A

medida que dispomos de inibidores químicos da IDO, é possível que esta estratégia tenha efeito sobre a angiogênese, sendo, portanto, positiva para o paciente oncológico.

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é analisar a expressão de IDO em células T24 de carcinoma de bexiga urinária em situação de hipóxia, a fim de correlacioná-la com a indução de angiogênese.

Mais especificamente, os objetivos são:

“in vitro”

1. Analisar a expressão de VEGF, HIF e IDO em células T24 submetidas à hipóxia;
2. Correlacionar a expressão de HIF e IDO em células T24 submetidas à hipóxia;
3. Analisar o efeito da inibição da IDO sobre a expressão de VEGF em células T24 submetidas à hipóxia;
4. Verificar o efeito da inibição da IDO sobre a viabilidade de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC);

“in vivo”

5. Analisar a formação de vasos em tumores de células T24 após inoculação em camundongos *nude*, através de imuno-histoquímica para VEGF, CD 31 e α SMA (do inglês *alpha smooth muscle actin*), a fim de correlacionar com a inibição de IDO por meio do metil-triptofano (MT).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fase “*in vitro*”

3.1.1 Cultura de células

Para o presente estudo, foram utilizadas células humanas T24 de carcinoma de bexiga urinária e células endoteliais humanas de cordão umbilical (HUVEC), adquiridas comercialmente da *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, EUA), via banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As células T24 foram mantidas em cultura com meio McCoy (Sigma, St. Louis, EUA), suplementado com soro fetal bovino 10 % (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil) e antibióticos (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 mg/mL, Sigma, St. Louis, EUA), a 37 °C com 5 % CO₂. Já as células HUVEC foram mantidas em meio 199 Earle suplementado com soro fetal bovino 10 % (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil) e antibióticos (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 mg/mL, Sigma, St. Louis, EUA), a 37 °C com 5 % CO₂.

As células são mantidas em garrafas de 75 cm² e, para os experimentos de hipóxia, foram cultivadas em placas de 6 *wells* (Corning, Nova Iorque, EUA).

3.1.2 Indução de hipóxia

A indução de hipóxia foi realizada artificialmente com a utilização de anaerobiose (AnaeroGen, Oxoid, Cambridge, Reino Unido). Para tanto, células T24 foram semeadas em placas de 6 wells e ao atingirem confluência de aproximadamente 75 % foram colocadas em sacos plásticos, fornecidos no kit Anaero-Gen, com um sachê capturador de oxigênio. O saco plástico foi selado e as células permaneceram por 1 hora, 8 horas,

24 horas e 48 horas. Ao final dos períodos de hipóxia, as células foram tripsinizadas (0,25 % durante 4 minutos a 37 °C) e congeladas para extração de RNA.

A Figura 1 ilustra as células T24 em placa de 6 *wells* submetidas à hipóxia.



Figura 1: Células T24 em cultura submetidas à hipóxia com kit AnaeroGen.

3.1.3 Extração de RNA

RNA total foi extraído das células em cultura utilizando-se o kit Paris (Invitrogen, Califórnia, EUA), seguindo-se o protocolo sugerido pelo 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. Foi feito o cálculo da concentração de RNA, expresso em $\mu\text{g/mL}$, a partir da absorbância à 260nm. A leitura de 1 OD corresponde a uma solução pura de RNA em fita-simples na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$. A leitura a 280 nm foi utilizada para determinar a contaminação das amostras com proteínas. A análise foi feita baseando-se na razão entre as absorbâncias a 260 e 280nm e o valor aceitável foi de 1,7 a 2,0.

Qualquer resíduo de DNA contaminante foi removido através DNase I (Invitrogen), na concentração de 1uni/ μg RNA na presença de 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, contendo 2 mM MgCl_2 por 15 minutos a 37 °C, seguido de incubação a 95°C durante 5 minutos para inativação da enzima. Logo após a quantificação, serão realizadas as reações de transcrição reversa (RT), para a síntese do cDNA.

3.1.4 RT-PCR em tempo real

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando-se a enzima M-MLV (Promega, Madison, EUA) e todos os reagentes adicionais foram adquiridos da mesma empresa. Quinhentos nanogramas de RNA total contidos em 11 μL de água livre de RNase foram misturados a 1 μL de dNTPs (10 mM) e a 1 μL de oligo (dT) (50 μM). A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e resfriada em gelo. Em seguida, foram adicionados 4 μL de solução tampão específica, 1 μL de inibidor de RNase e 1 μL da M-

MLV. A mistura foi aquecida a 42°C por 60 minutos e a 70°C por 15 minutos. Após a reação, as amostras permaneceram a -20°C.

Para a PCR, foram confeccionados pares de *primers* para a obtenção de *amplicons* com no máximo 250 pb, conforme recomendação para PCR em tempo real. Estes *primers* foram também submetidos ao RT-PCR convencional para validação da temperatura de anelamento. Os *primers* utilizados estão apresentados na Tabela 1.

Para a PCR em tempo real foi utilizado o kit Sybr Mix (Invitrogen, Califórnia, EUA). Um microlitro de cDNA foi acrescido de 24µL de PCR Sybr Mix, acrescidos dos *primers* específicos. Todas as reações foram realizadas em duplicatas. A mistura foi aquecida a 50°C por 10 minutos e depois a 95°C por 5 minutos, seguindo para 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. A curva de *melting* foi feita à 65°C, com variação de 1°C. O equipamento utilizado foi o 7500™ *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Califórnia EUA).

Após a PCR em tempo real, o *cycle threshold* (C_t) 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 $\Delta\Delta C_t$ (ΔC_t housekeeping - ΔC_t alvo) e $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

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

Gene alvo	Primer forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
TBP	TTCGGAGAGTTCTGGGATTGTA	TGGACTGTTCTTCACTCTTGCC
VEGF	AGAGATGCAACTAAGCCCTCT	AAGCAGCTACTGACAGGCAC
HIF-1	ACGTCGTAATCACCACACTGA	TTCGTCACTGCTACGTGTAGAA
IDO	CCTGGGGTACATCACCATGGCG	TTGCGGGGCAGCACCTTTCCG

3.1.5 Ensaio de viabilidade celular para células HUVEC

As células HUVEC foram subcultivadas em garrafas de cultura de 25 cm², previamente revestidas com gelatina 0,1 %.

A viabilidade celular foi realizada através da análise da atividade mitocondrial. Para tanto, utilizou-se o ensaio do MTT, uma técnica indireta baseada na análise colorimétrica da habilidade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase (encontrada somente em células viáveis). Ao clivar enzimaticamente os anéis de tetrazólio do MTT, formam-se cristais azuis escuros de formazana, os quais são impermeáveis às membranas celulares, ficando, então, retidos no interior das células viáveis. A posterior lise celular faz com que estes sais de formazana sejam liberados. O número de células viáveis é diretamente proporcional à concentração de cristais de azul de formazana formados.

As células HUVEC foram semeadas em placas de cultura de fundo chato de 96 *wells* (Corning, Nova Iorque, EUA) (1×10^4 células/*well*), e ao atingirem confluência de aproximadamente 75 %, passaram por um período de 24 horas de privação de soro fetal bovino (*starvation*). Após este período, o soro fetal bovino foi devolvido às células, permanecendo por 48 horas. Células de 5 *wells* receberam o inibidor da IDO 1-metil triptofano (MT, Sigma, St. Louis, EUA), na concentração de 1 mM, previamente dissolvido no meio de cultura. As células dos outros 5 *wells* não receberam MT.

Após o período de cultivo, foi realizada a lavagem dos poços com 200 µL de PBS 1X. Em seguida, foram adicionados 50 µL de MTT (0,5 µg/mL em tampão) (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue, Sigma, St. Louis, EUA) e realizada uma incubação de 3 horas a 37°C em estufa de CO₂.

Terminado o tempo de incubação, esta solução foi removida cuidadosamente e foram adicionados 100 μ L de Isopropanol para ressuspender e solubilizar o precipitado. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância a 620 nm com auxílio de um leitor de placas (Anthos 2020, Eugendorf, Austria).

Os resultados estão apresentados na forma de densidade óptica.

3.2 Fase “*in vivo*”

3.2.1 Animais

Para o presente estudo, foram utilizados 8 animais Balb/c *nude*, criados no biotério central da UNINOVE, unidade Vergueiro. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética com Uso de Animais (CEUA) da Universidade Nove de Julho (processo AN0012013).

3.2.2 Inoculação de células pela via subcapsular renal

O procedimento iniciou 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 100mg/kg e 10mg/kg. Após anestesia do animal, foi realizada assepsia do local com gluconato de clorexidina e posicionamento para imobilização do animal em decúbito lateral direito. A partir de uma incisão cutânea na região dorsolateral, perpendicularmente ao gradil costal, de aproximadamente um centímetro, foi visualizada a camada muscular, a qual sofreu incisão com extensão semelhante à da pele, tendo-se acesso ao rim esquerdo do camundongo, que foi delicadamente exteriorizado.

Com o auxílio de uma seringa Hamilton com uma agulha de 23G acoplada, infundiu-se sob a cápsula renal em um ângulo proximal a alíquota de 1×10^6 de células suspensa em 10uL de PBS, conforme descrito anteriormente. Em seguida, a abertura feita na cápsula com a agulha foi cauterizada para evitar refluxo das células. Após reposicionamento ortotópico, as incisões muscular e cutânea foram suturadas com fio 6.0. Todo o procedimento teve duração aproximada de 30 minutos, tempo coberto pelo

regime anestésico. O procedimento está ilustrado na Figura 2.

Finalizado o procedimento, o animal permaneceu em pós-operatório com temperatura controlada e hidratação. O mesmo ficou em observação por um período entre 30 a 60 minutos. Após este período, o camundongo foi isolado de outros animais, para que sua sutura não fosse danificada por outros animais. Como manobra analgésica, foi administrado cloridrato de tramadol por via intramuscular na concentração de 5mg/kg nas primeiras 48 horas pós-cirurgia.

Quatro animais receberam MT na água de beber, na concentração de 5 mg/ml, enquanto os outros quatro animais permaneceram sem receber MT. Os grupos foram mantidos por 30 dias, com um acompanhamento clínico diário.

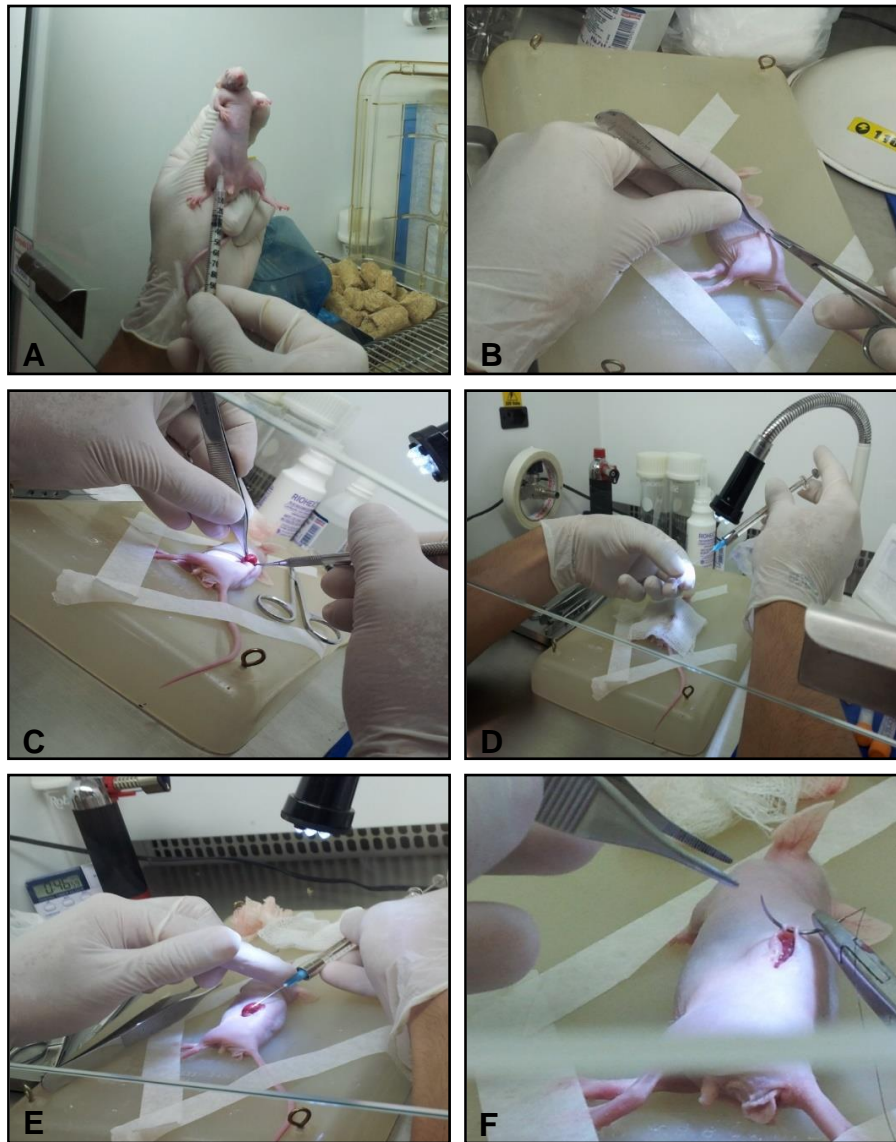


Figura 2: Ilustração do procedimento de inoculação subcapsular renal de células T24. (A) Injeção intraperitoneal de anestésico. (B) Incisão lombar para exposição do rim esquerdo. (C) Exposição do rim esquerdo. (D) Coleta das células em seringa Hamilton. (E) Inoculação das células no espaço subcapsular renal. (F) Sutura cutânea após ter sido realizada a sutura muscular.

3.2.3 Eutanásia e coleta de material

Após 30 dias do processo de inoculação subcapsular renal, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de dose letal de anestésico (4x a dose preconizada para anestesia, com Xilazina e Ketamina), via intraperitoneal. Após a constatação de ausência de sinais vitais, procedeu-se a retirada do material.

Para o controle de VEGF, foi utilizado um fragmento de coração de camundongo com aproximadamente 5 mm, que foi previamente lavado em solução fisiológica e permaneceu 45 minutos em solução de Duboscq-Brazil. Em seguida, o fragmento foi identificado e colocado em caixeta perfurada e mantido em solução de formol 10% em tampão fosfato até a inclusão em blocos de parafina.

Para os demais testes, foram utilizados fragmentos dos rins infundidos dos camundongos, com aproximadamente 5 mm, que foram previamente lavados em solução fisiológica e permaneceram 45 minutos em solução de Duboscq-Brazil. Em seguida, os fragmentos foram identificados e colocados em caixetas perfuradas e mantidos em solução de formol 10 % em tampão fosfato até a inclusão em blocos de parafina.

3.2.4 Imuno-histoquímica

Para as técnicas de imuno-histoquímica, foram utilizados anticorpos específicos para analisar VEGF (Anti-VEGF, Santa Cruz, Califórnia, EUA), CD-31 (Anti-CD31, Santa Cruz, Califórnia, EUA), α -SMA (anti- α -SMA, do inglês *smooth muscle actin*, Dako, Carpinteria, EUA) e IDO (Anti-IDO, Millipore, Califórnia, USA).

Para a imuno-histoquímica, as lâminas passaram por um processo de desparafinização e permaneceram em estufa entre 60 °C e 65 °C por 24 horas. Ao serem retiradas da estufa foram submersas em xilol aquecido (Synth, São Paulo, Brasil) durante 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em cada etapa por 30 segundos na seguinte sequência: etanol absoluto (Synth, São Paulo, Brasil), etanol 80 %, etanol 70 % e água destilada. Após a sequência dos álcoois, as lâminas ficaram submersas em ácido fórmico durante 3 minutos.

A técnica da panela a vapor foi utilizada para aumentar a exposição antigênica, uma vez que durante o processo de parafinização pode ocorrer o “mascaramento” de antígenos no tecido dificultando assim sua detecção. Para tanto, as lâminas foram imersas em tampão citrato 10 X (2,1 g de ácido cítrico mono hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha) dissolvidos em água destilada Milli-Q e levadas para a panela a vapor (Sanyo, São Paulo, Brasil). Este procedimento foi realizado uma vez durante 30 minutos a aproximadamente 85 °C, seguido por 20 minutos em temperatura ambiente para o resfriamento das lâminas.

O método da peroxidase foi utilizado para a imuno-marcação de VEGF e IDO. Para este método, as lâminas permaneceram em água oxigenada 3 % (Synth, São Paulo, Brasil) por 30 minutos. Para a retirada da água oxigenada, foram lavadas em água corrente e água destilada, permanecendo posteriormente em PBS. A solução PBS foi preparada utilizando-se os reagentes fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2 \text{H PO}_4$) (Synth, São Paulo, Brasil), fosfato de sódio monobásico ($\text{Na H}_2 \text{ PO}_4$) (Synth, São Paulo, Brasil) e cloreto de sódio (Synth, São Paulo, Brasil) para as concentrações 0,007 M, 0,025 M e

0,14 M, respectivamente. O pH desta solução foi ajustado para 7,4 com ácido clorídrico (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Após o bloqueio de peroxidase endógena, as lâminas passaram por bloqueios específicos para Avidina e Biotina endógenas, por 15 minutos cada bloqueio, intercalados com um tempo de permanência em PBS durante 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram então incubadas com leite Mólico 6% em PBS, durante 15 minutos e, após a retirada do excesso do leite, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário específicos, durante a noite a 4 °C. No dia seguinte, os cortes foram lavados em PBS por 5 minutos e incubados com os reagentes do kit LSAB+ System-HRP (Dako, Carpinteria, EUA). A revelação foi realizada com Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Dako, Carpinteria, EUA).

As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 7 minutos e lavadas em água corrente. As lâminas foram então montadas com glicergel (Merck, Darmstadt, Alemanha).

O método da fosfatase foi utilizado para a imuno-marcação de CD31 e α SMA. Para este método, não há bloqueio da peroxidase endógena, como descrito acima, e o kit utilizado foi LSAB-System-AP (Dako, Carpinteria, EUA). A revelação foi realizada com *Permanent-RED* (K064011, Dako, Carpinteria, EUA) diluído 1:50 em *Liquid Permanent Red Substrate Buffer* (K064030, Dako, Carpinteria, EUA).

3.2.5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos em média \pm erro padrão. Os dados foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), com pós-teste Newman-Keuls, para verificar diferenças entre mais de dois grupos estudados. Para a análise de correlação, foi aplicado o método de Spearman para dados não paramétricos. Os cálculos foram realizados através do software GraphPad Prism, versão 2.01. A significância de $p < 0,05$ foi adotada.

5 RESULTADOS

5.1 Fase “*in vitro*”

5.1.1 Indução de hipóxia em células T24

As células T24 foram submetidas à hipóxia por 8 h, 24 h e 48 h, demonstrando resistência à carência de oxigênio. A Figura 3 ilustra as células em cultura após 48 h de hipóxia. Observa-se diminuição do número de células e alteração da forma das células (Figura 3B).

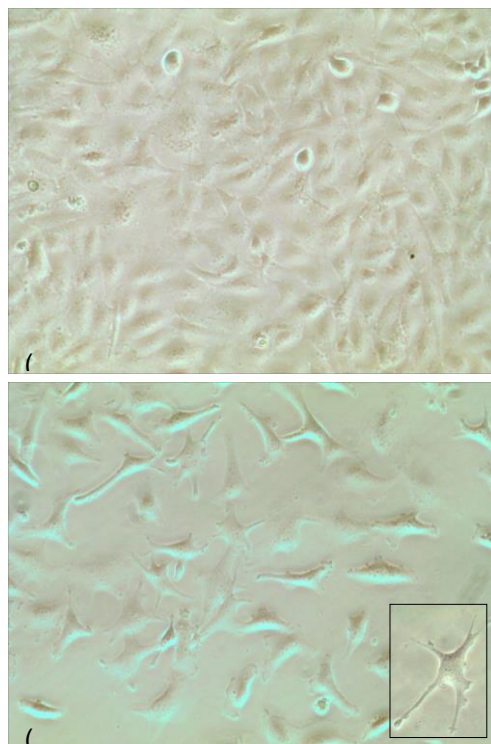


Figura 3: Células T24 em cultura. (A) sem hipóxia e (B) após 48 h de hipóxia. Nota-se menor número de células após indução de hipóxia, bem como alteração da morfologia celular (inseto) células densas

5.1.2 Expressão de VEGF

Os resultados do presente estudo demonstram que células T24 produzem VEGF “*in vitro*” de maneira constitutiva e quando submetidas à hipóxia a expressão de VEGF não aumentou após 1 hora (expressão relativa de $1,00 \pm 0,10$ no Controle vs. $0,96 \pm 0,06$ na Hipóxia), porém aumentou significativamente após 8 horas (expressão relativa de $1,00 \pm 0,07$ no Controle vs. $2,68 \pm 0,67$ na Hipóxia; $p < 0,05$), após 24 horas (expressão relativa de $1,00 \pm 0,41$ no Controle vs. $5,61 \pm 1,07$ na Hipóxia; $p < 0,05$) e após 48 horas (expressão relativa de $1,00 \pm 0,51$ no Controle vs. $13,16 \pm 0,83$ na Hipóxia; $p < 0,05$) (Figura 4). O aumento da expressão de VEGF foi proporcional ao tempo de hipóxia (Figura 4).

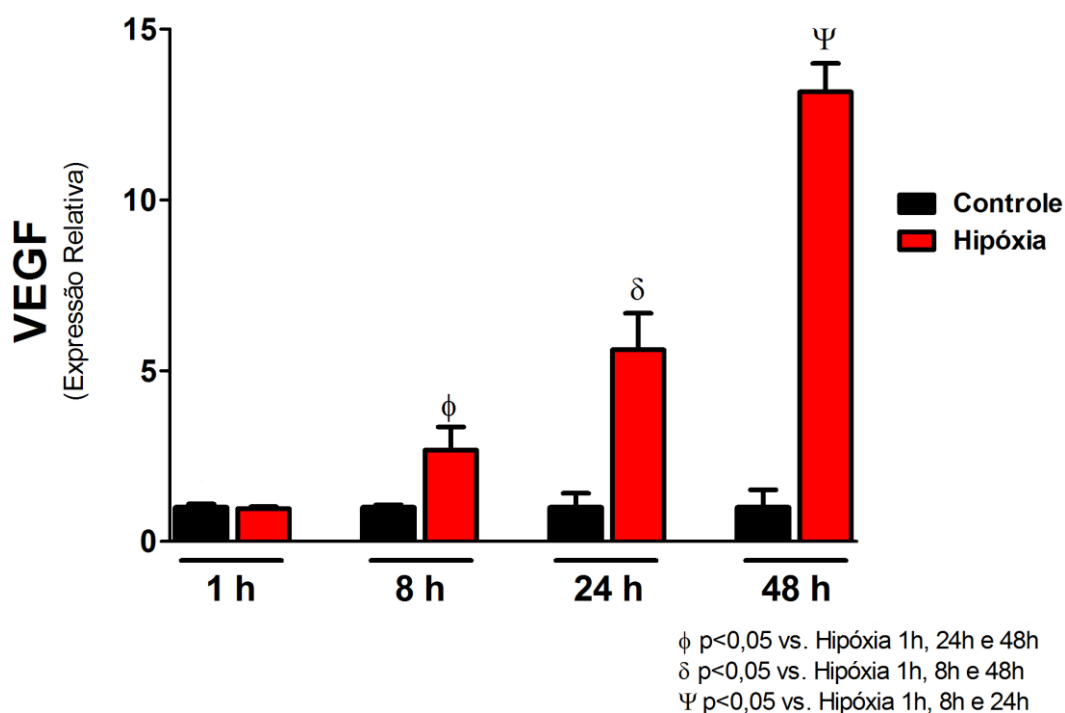


Figura 4: Expressão de VEGF por RT-PCR em tempo real em células T24 submetidas ou não à hipóxia em 4 períodos

5.1.3 Expressão de HIF

Os resultados do presente estudo demonstram que a expressão de HIF analisada por RT-PCR em tempo real não se altera significativamente em células T24 submetidas à hipóxia nos 4 períodos de incubação estudados. Há um aumento com 24 horas, porém sem diferença significativa. A expressão relativa após 1 hora foi de $1,00 \pm 0,13$ no Controle vs. $0,86 \pm 0,18$ na Hipóxia, após 8 horas foi de $1,07 \pm 0,29$ no Controle vs. $0,51 \pm 0,15$ na Hipóxia, após 24 horas foi de $1,13 \pm 0,41$ no Controle vs. $3,31 \pm 2,38$ na Hipóxia, e após 48 horas foi de $1,00 \pm 0,88$ no Controle vs. $0,30 \pm 0,89$ na Hipóxia (Figura 5).

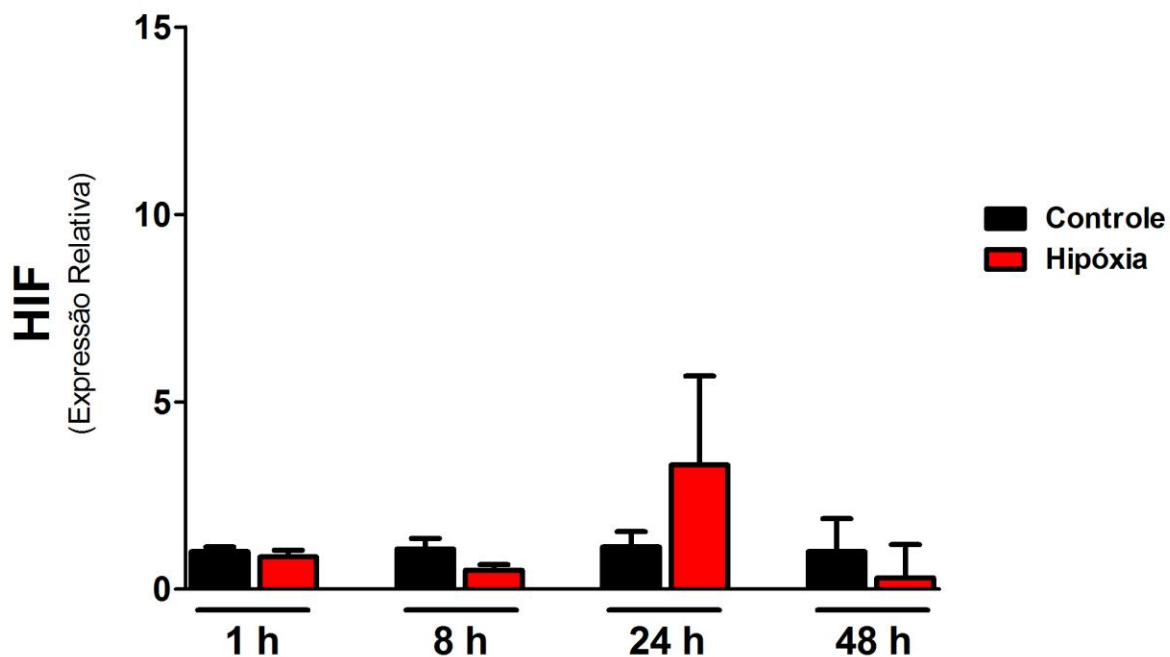


Figura 5: Expressão de HIF por RT-PCR em tempo real em células T24 submetidas ou não à hipóxia (n=3 para cada

5.1.4 Expressão de IDO

Os resultados do presente estudo demonstram que há expressão de IDO de maneira constitutiva em células T24, porém não conseguimos detectar alteração significativa durante os 4 períodos de hipóxia. A expressão relativa de IDO após 1 hora foi de $1,00 \pm 0,10$ no Controle vs. $1,10 \pm 0,20$ na Hipóxia, após 8 horas foi de $1,01 \pm 0,09$ no Controle vs. $0,82 \pm 0,22$ na Hipóxia, após 24 horas foi de $1,14 \pm 0,43$ no Controle vs. $2,07 \pm 1,44$ na Hipóxia, e após 48 horas foi de $1,00 \pm 0,69$ no Controle vs. $0,19 \pm 0,42$ na Hipóxia (Figura 6).

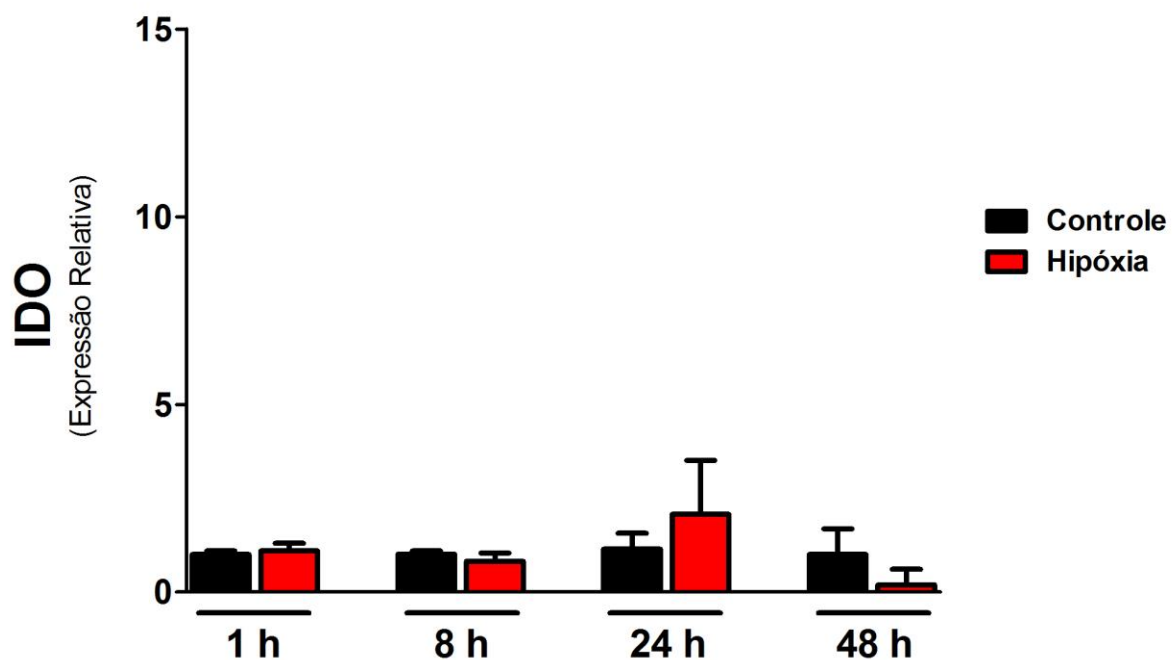


Figura 6: Expressão de IDO por RT-PCR em tempo real em células T24 submetidas ou não à hipóxia ($n=3$ para cada

5.1.5 Correlação entre HIF e IDO em todos os tempos

Os resultados relacionados com a expressão de HIF e IDO em células T24 submetidas à hipóxia demonstram que não há alterações significativas nesta expressão. Entretanto, analisando os gráficos das Figuras 5 e 6, é possível perceber que a expressão de IDO acompanha a expressão de HIF, ou seja, quando há aumento dos níveis basais do HIF, também podemos observar aumento da expressão da IDO. Para confirmar esta observação, aplicamos dois métodos estatísticos: a regressão linear e a correlação, utilizando os valores de expressão relativa, tanto dos casos Controle como dos casos Hipóxia, em todos os tempos de incubação. Conforme demonstrado na Figura 7, a análise de regressão linear mostrou significância ($p < 0,0001$), ou seja, a expressão de IDO aumenta à medida que há aumento da expressão de HIF. A análise de correlação acusou um coeficiente de 0,615 e um r^2 de 0,001, confirmando a correlação positiva e significativa entre as duas moléculas (análise não-paramétrica de Spearman).

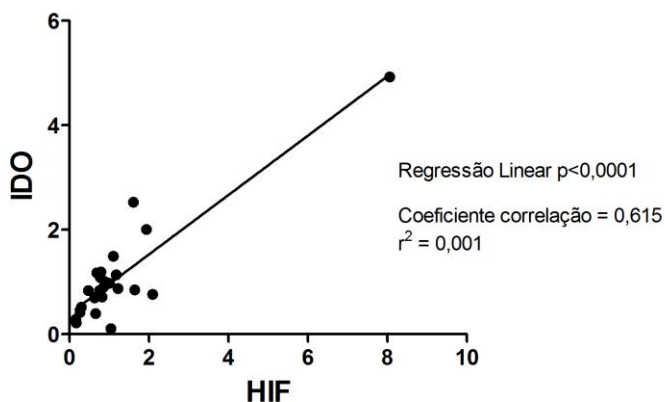


Figura 7: Expressão de IDO por RT-PCR em tempo real em células T24 submetidas ou não à hipóxia (n total de 24

5.1.6 Efeito do MT sobre a expressão de VEGF

Células foram incubadas com MT, o inibidor daIDO, durante 48 horas. Podemos observar na Figura 8 que o tratamento com MT aumentou a expressão de VEGF em células não submetidas à hipóxia (expressão relativa de $1,00 \pm 0,51$ no Controle vs. $4,66 \pm 0,40$ no MT; $p < 0,05$), porém diminuiu a expressão de VEGF em células submetidas à hipóxia (expressão relativa de $13,16 \pm 0,83$ no Hipóxia vs. $3,08 \pm 1,51$ no Hipóxia+MT; $p < 0,05$).

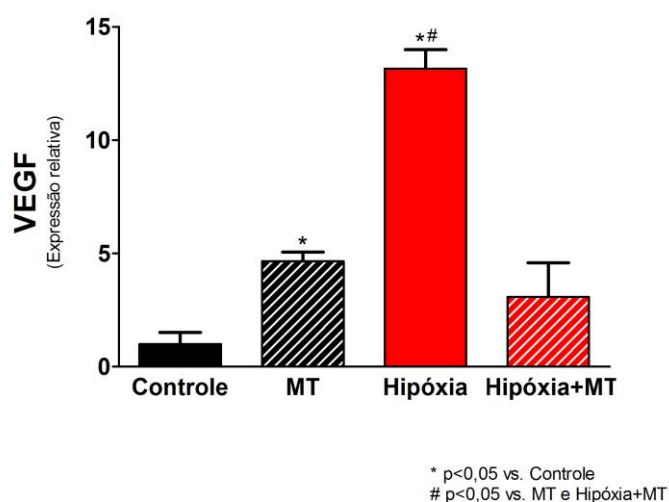


Figura 8: Expressão de VEGF em células T24 após tratamento com MT (inibidor de IDO) ($n=3$ para cada

5.1.7 Viabilidade de células HUVEC tratadas com MT

Para analisar o efeito da inibição química daIDO sobre a viabilidade de células HUVEC (utilizadas em ensaios sobre o processo de angiogênese), as células foram incubadas por 48 horas e submetidas as ensaio de MTT, que avalia a atividade mitocondrial das células. Conforme demonstrado na Figura 9, o tratamento das células HUVEC com MT diminuiu significativamente a viabilidades destas células (densidade óptica de $0,23 \pm 0,02$ no Controle vs. $0,16 \pm 0,01$ no MT; $p < 0,05$).

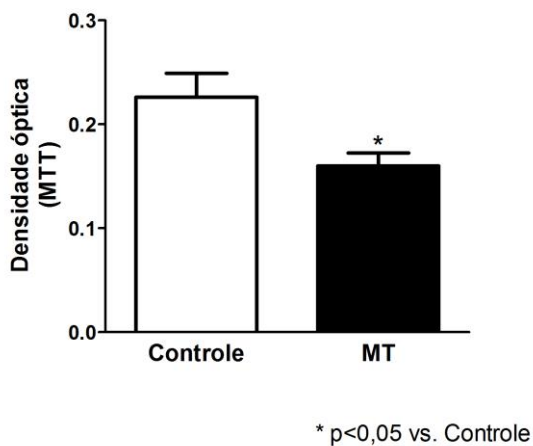


Figura 9: Viabilidade das células HUVEC após 48 horas de incubação, avaliada através do método MTT ($n=5$ cada

5.2 Fase “*in vivo*”

5.2.1 Inoculação de células T24 no espaço subcapsular renal

A inoculação das células T24 foi realizada com sucesso. Conforme a Figura 10, uma parte das células ficou limitada no espaço subcapsular renal (Figura 10A), enquanto uma parte infiltrou no parênquima renal no sentido da medula renal, após 30 dias da inoculação.

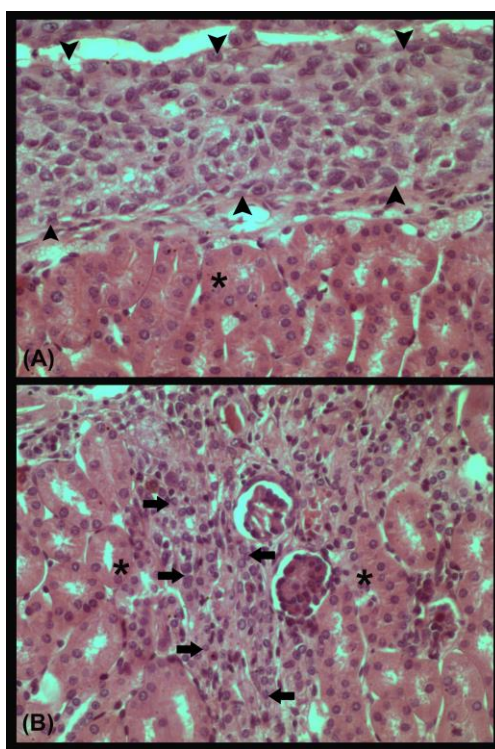


Figura 10: Rim de camundongo Balb-c nude após 30 dias da inoculação de células T24. (A) Parte das células ficaram limitadas ao espaço subcapsular renal, enquanto que (B) uma parte infiltrou no parênquima renal. As cabeças de setas indicam células T24 no espaço subcapsular renal, enquanto

5.2.2 Padronização de imuno-histoquímica para VEGF

A padronização da imuno-histoquímica foi realizada para analisar a expressão de VEGF em células T24 inoculadas em camundongos Balb/c nude. Como controle positivo de VEGF, foi utilizado tecido cardíaco, onde podemos visualizar a marcação para VEGF em miocárdio e em vasos sanguíneos (Figura 11). A padronização foi realizada com sucesso.

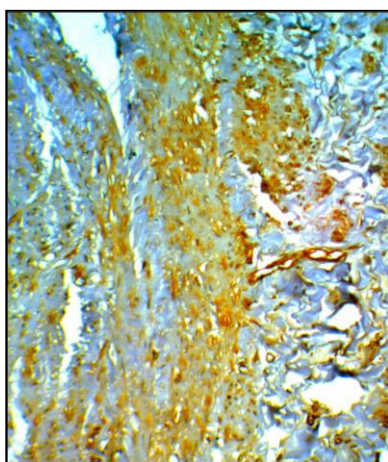


Figura 11: Expressão de VEGF em tecido cardíaco. Células do miocárdio e vasos sanguíneos aparecem marcados para

5.2.3 Imuno-histoquímica para VEGF em células T24 inoculadas

Como demonstrado na imagem abaixo, há marcação de VEGF em células T24 inoculadas na região subcapsular renal de camundongos Balb/c nude. Além disso, positividade para IDO foi identificada também em túbulos renais dos camundongos receptores das células (Figura 12).

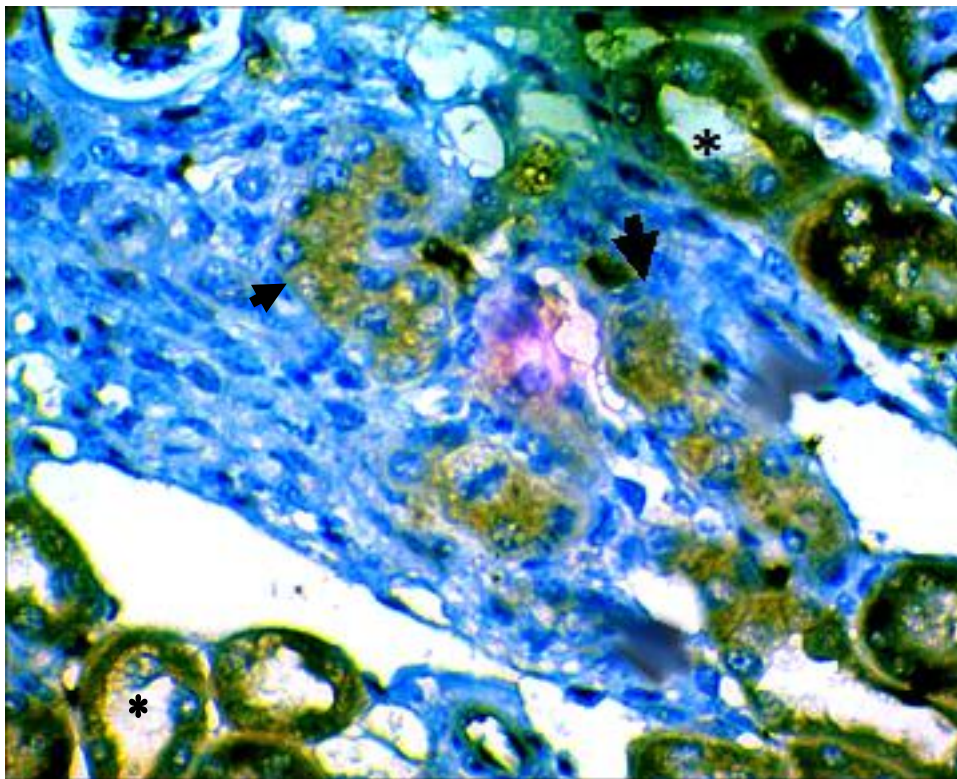


Figura 12: Imuno-histoquímica para VEGF em células T24 inoculadas via subcapsular renal. As setas indicam células

5.2.4 Imuno-histoquímica para CD-31 em células T24 inoculadas

Imuno-histoquímica para CD31 foi realizada para a identificação de células endoteliais, a fim de quantificarmos os vasos formados nos tumores subcapsulares de células T24. Conforme demonstrado na Figura 13, foi possível marcarmos as células endoteliais de vasos formados nos tumores. Acreditamos que o intenso *background* se dê por conta do CD31 solúvel e do encontrado em plaquetas.

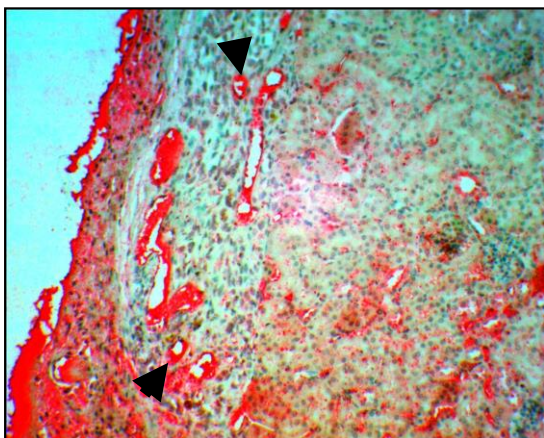


Figura 13: Imuno-histoquímica para CD-31 em células T24 inoculadas via subcapsular renal. As setas indicam vasos

5.2.5 Imuno-histoquímica para α -SMA

Além de imuno-histoquímica para CD31, antígeno envolvido em eventos interativos durante angiogênese, realizamos imuno-histoquímica para α -SMA, pois é um marcador de células musculares lisas, sendo assim importantes para quantificarmos vênulas e arteríolas formadas nos tumores subcapsulares. A Figura 14 ilustra a marcação para α -SMA em vasos tumorais.

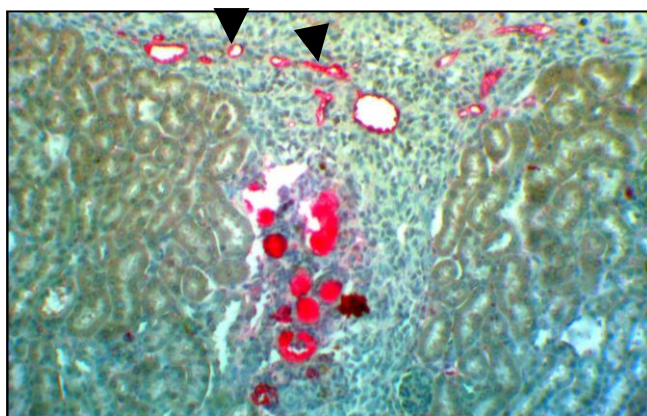


Figura 14: Imuno-histoquímica para α -SMA em células T24 inoculadas via subcapsular renal. As setas indicam vasos

5.2.6 Imuno-histoquímica para IDO

Para verificar se a expressão de IDO encontrada em cultura permanece em células T24 inoculadas em camundongos Balb/c nude após 30 dias, foi realizada imuno-histoquímica para IDO.

Conforme ilustrado na Figura 15, há marcação para IDO em células T24 infiltradas no parênquima renal.

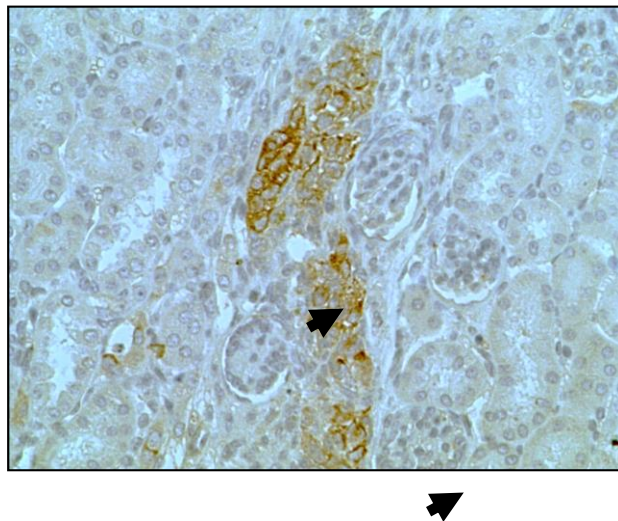


Figura 15: Imuno-histoquímica para IDO em células T24 inoculadas via subcapsular renal. As setas indicam a

5.2.7 Análise de tumores de células T24

Oito animais Balb/c nude foram receptores de células T24 sob a cápsula renal e permaneceram com as células por 30 dias. Quatro foram tratados com MT, enquanto quatro receberam apenas veículo. Conforme demonstrado na Tabela 2, os animais tratados com MT apresentaram apenas células infiltrantes, enquanto a maioria dos animais tratados apenas com veículo apresentaram células no espaço subcapsular renal e infiltrantes. Desta maneira, não tivemos uma massa considerável para a contagem de vasos tumorais nos animais tratados com MT.

Tabela 2. Animais Balb/c nude receptores de células T24 no espaço subcapsular renal.

		Células T24 no espaço subcapsular	Células T24 infiltrantes
Veículo	<i>nude 1</i>	Sim	Sim
	<i>nude 2</i>	Não	Sim
	<i>nude 3</i>	Sim	Sim
	<i>nude 4</i>	Sim	Não
Tratamento com MT	<i>nude 5</i>	Não	Sim
	<i>nude 6</i>	Não	Sim
	<i>nude 7</i>	Não	Sim
	<i>nude 8</i>	Não	Sim

6 DISCUSSÃO

Clinicamente, a expressão de IDO “*in situ*” correlaciona-se com progressão de câncer endometrial, funcionando como marcador para pior prognóstico clínico ²². Na mesma linha de estudo, a expressão de IDO está correlacionada com diminuição da sobrevida e pior prognóstico para portadores de câncer ovariano ²³. Além disso, a expressão de IDO está presente também em câncer colorretal e está relacionada à metástase hepática e diminuição de linfócitos T ²⁴. Embora efeito semelhante tenha sido percebido em carcinoma hepatocelular ²⁵, estudo com cocultura de células mononucleares de sangue periférico e células de carcinoma hepatocelular demonstrou que a IDO é importante para a atividade imune anti-câncer ²⁶. Este efeito contraditório é reforçado por evidências de que há expressão de IDO em células endoteliais presentes em carcinoma renal, correlacionando-se com maior sobrevida dos pacientes ²⁷.

Este efeito paradoxo pode ser explicado pelo fato de que a IDO pode exercer efeito protetor a tumores quando há reatividade do sistema imunológico contra as células neoplásicas. Já em situações onde o sistema imunológico não representa “perigo” ao tumor, a IDO pode não ser interessante.

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 daIDO sobre a expressão do VEGF-A.

Há evidências de que a IDO pode estar relacionada com mecanismos angiogênicos, especialmente porque a sua expressão foi encontrada em células endoteliais de tecidos com intensa angiogênese, tal como a placenta (Blaschitz, 2011). No câncer, a IDO tem sido apontada como uma molécula-chave para induzir o escape do tumor a partir do sistema imunológico, devido seus efeitos imunossupressores locais (Platten, 2012). Se a IDO está envolvida na angiogênese tumoral, além de seus mecanismos imunomoduladores que promovem a fuga tumor, a IDO pode se tornar um alvo atraente para terapias anticancerígenas. De fato, em um ensaio de fase I, IDO foi combinada com docetaxel em pacientes com tumores sólidos metastáticos (Soliman, 2014). Em um modelo pré-clínico de câncer de bexiga, o inibidor da IDO foi utilizado em combinação com o inibidor da enzima metabólica APO886, potencializando a inibição do tumor (Yang, 2010).

Nossos resultados mostraram que o AnaeroGen foi eficaz em induzir a expressão do VEGF-A de uma maneira tempo-dependente, atingindo um pico ao fim de 48 horas de hipóxia. Como o HIF-1 α é um potente indutor do VEGF-A, também analisamos a sua expressão e constatamos que o mRNA para HIF-1 α não aumentou ao longo do tempo de hipóxia. Temos duas hipóteses para não haver aumento do mRNA do HIF-1 α , em primeiro lugar, a proteína de HIF-1 α pode ser aumentada de forma independente do mRNA do HIF-1 α . De fato, o aumento de proteína de HIF-1 α na célula hipóxica é devido a uma redução da sua degradação e não necessariamente pela sua

suprarregulação. Jones et al. demonstraram que células T24 expostas a hipoxia tinham aumento na expressão do VEGF-A após 16 horas de hipoxia (somente este tempo foi analisado), acompanhados por elevação da proteína HIF-1 α , sem alterar o mRNA do HIF-1 α (Jones, 2001). Em segundo lugar, um pico de mRNA do HIF-1 α pode ter ocorrido em um curto espaço de tempo e não fomos capazes de detectá-lo.

A expressão daIDO não foi alterada significativamente pela hipoxia. No entanto, essa expressão pode ser correlacionada com a expressão basal de HIF-1 α . A análise de correlação e regressão linear, demonstraram que aIDO e o HIF-1 α apresentaram uma associação positiva significativa. Assim, não descartamos a possibilidade da expressãoIDO ter apresentado pico em conjunto com HIF-1 α .

Quando usado 1-metil-triptofano, observou-se uma infrarregulação significativa do VEGF-A. Assim, a inibiçãoIDO durante a condição de hipoxia diminui a expressão do VEGF-A, indicando um papel daIDO na angiogênese do câncer de bexiga.

É possível que exista uma via de sinalização comum entre aIDO, HIF-1 α e VEGF-A. O grupo de Semenza tem sido pioneiro nos estudos de HIF-1 α e VEGF-A e demonstraram que o VEGF não pode ser induzida por HIF-1 se a sua unidade β é interrompido (Forsythe, 1996). O HIF-1 β , também chamado de translocador nuclear do receptor de aril hidrocarbono, é essencial para formar a função do receptor (Yamaguchi, 1995). Mais recentemente, o receptor de aril hidrocarbono tem sido fortemente associado com a quinurenina, o primeiro produto catabólico produzido pelaIDO. A Quinurenina ativa o receptor de aril hidrocarbono para induzir os mecanismos de imunidade tumoral (Bessede, 2014; Platten, 2012; Optiz, 2011). Além disso, a ativação

do receptor de aril hidrocarbono induz a expressão de VEGF em células de hepatocarcinoma no fígado (Terashima, 2013).

Se a quinurenina produzida pela IDO é necessária para ativar o receptor de aril hidrocarbono, o qual depende do HIF-1 para induzir a expressão do VEGF, faz sentido a expressão da IDO acompanhar a expressão de HIF-1. No entanto, mais estudos são necessários para descrever esse possível mecanismo.

Dessa forma, concluímos que o AnaeroGen é um método simples e eficiente para induzir a hipóxia com aumento da expressão do VEGF-A em células T24 de carcinoma da bexiga humana. A expressão basal de HIF-1 α correlaciona-se com a expressão da IDO e a inibição da IDO regula negativamente a expressão de VEGF-A em células T24 hipóxicas. Este efeito de inibição IDO pode ser explorado para o tratamento de câncer de bexiga.

7 CONCLUSÕES

- 1) Foi possível induzir hipóxia em células T24 com o produto AnaeroGen;
- 2) A expressão de VEGF aumentou significativamente e de forma gradativa, tempo-dependente;
- 3) A expressão de HIF e IDO não sofreram alterações significativas nos períodos de hipóxia estudados, porém houve uma correlação significativa entre as duas molecular;
- 4) A inibição da IDO diminui a viabilidade de células endoteliais (HUVEC), demonstrando a importância da IDO na manutenção destas células;
- 5) A inoculação subcapsular renal de células T24 confere um modelo interessante para a formação de tumor com formação de neovasos;
- 6) Não foi possível avaliar o efeito da inibição da IDO na formação de neovasos nos animais tratados com o MT, pois não houve formação de tumores.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86. doi: 10.1002/ijc.29210.
2. Alwan, Ala. Global status report on noncommunicable diseases 2010. *World Health Organization*, Genebra, Suíça, 2011.
3. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2014 – Incidência de Câncer Não Brasil. Rio de Janeiro: *INCA*, 2014. 124p.
4. The Angiogenesis Foundation. How is Angiogenesis Important for Health? Historical Highlights. Disponível em: <http://www.angio.org/learn/angiogenesis/>. Acesso em: 26/Junho/2014.
5. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*. 1995 Jan;1(1):27-31.
6. Jain RK, Carmeliet P. SnapShot: Tumor angiogenesis. *Cell*. 2012 Jun 8;149(6):1408-1408.e1.
7. Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res*. 1996;69:135-74.
8. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*. 1996 Sep;16(9):4604-13.
9. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*. 1993 Apr 29;362(6423):841-4.
10. Micha JP, Goldstein BH, Rettenmaier MA, Genesen M, Graham C, Bader K, Lopez KL, Nickle M, Brown JV 3rd. A phase II study of outpatient first-line paclitaxel,

carboplatin, and bevacizumab for advanced-stage epithelial ovarian, peritoneal, and fallopian tube cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2007 Jul-Aug;17(4):771-6.

11. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*. 1998 Aug 21;281(5380):1191-3.

12. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* 189:1363-72, 1999.

13. Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* 196:447-57, 2002.

14. Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 9:1069-77, 2002.

15. Uyttenhove C, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nature Med* 9, 1269–1274, 2003.

16. 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.

17. Chang, M. Y. et al. Bin1 ablation in mammary gland delays tissue remodeling and drives cancer progression. *Cancer Res* 67, 100–107, 2007.

18. Ge K, et al. Loss of heterozygosity and tumor suppressor activity of Bin1 in prostate carcinoma. *Int. J. Cancer* 86, 155–161, 2000.

19. Ge K, et al. Losses of the tumor suppressor BIN1 in breast carcinoma are frequent and reflect deficits in programmed cell death capacity. *Int J Cancer* 85, 376–383, 2000.

- 20.** Tajiri T, et al. Expression of a MYCN-interacting isoform of the tumor suppressor BIN1 is reduced in neuroblastomas with unfavorable biological features. *Clin Cancer Res* 9, 3345–3355, 2003.
- 21.** Ge K, et al. Mechanism for elimination of a tumor suppressor: aberrant splicing of a brain-specific exon causes loss of function of Bin1 in melanoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 9689–9694, 1999.
- 22.** Ino K, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer. *Br J Cancer* 95,1555–1561, 2006.
- 23.** Takao M, et al. Increased synthesis of indoleamine-2,3-dioxygenase protein is positively associated with impaired survival in patients with serous-type, but not with other types of, ovarian cancer. *Oncol Rep* 17, 1333–1339, 2007.
- 24.** Brandacher G, et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Res* 12,1144–1151, 2006.
- 25.** Pan K, et al. Expression and prognosis role of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*,134, 1247–1253, 2008.
- 26.** Ishio T, et al. Immunoactivative role of indoleamine 2,3-dioxygenase in human hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol Hepatol* 19,319–326,2004.
- 27.** Riesenberger R, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor endothelial cells correlates with long-term survival of patients with renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res* 13,6993–7002, 2007.
- 28.** Motz GT1, Coukos G. The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: cancer and other tales. *Nat Rev Immunol*. 2011 Sep 23;11(10):702-11.
- 29.** Duechler M, Peczek L, Zuk K, Zalesna I, Jeziorski A, Czyz M. The heterogeneous immune microenvironment in breast cancer is affected by hypoxia-related genes. *Immunobiology*. 2014 Feb;219(2):158-65.
- 30.** Blaschitz A, Gauster M, Fuchs D, Lang I, Maschke P, Ulrich D, Karpf E, Takikawa O, Schimek MG, Dohr G, Sedlmayr P. Vascular endothelial expression of indoleamine 2,3-

dioxygenase 1 forms a positive gradient towards the feto-maternal interface. *PLoS One*. 2011;6(7):e21774.

31. Milano F, Jorritsma T, Rygiel AM, Bergman JJ, Sondermeijer C, Ten Brinke A, vanHam SM, Krishnadath KK. Expression pattern of immune suppressive cytokines and growth factors in oesophageal adenocarcinoma reveal a tumour immune escape-promoting microenvironment. *Scand J Immunol*. 2008 Dec;68(6):616-23.

32. Ritter MR, Moreno SK, Dorrell MI, Rubens J, Ney J, Friedlander DF, Bergman J, Cunningham BB, Eichenfield L, Reinisch J, Cohen S, Veccione T, Holmes R, Friedlander SF, Friedlander M. Identifying potential regulators of infantile hemangioma progression through large-scale expression analysis: a possible role for the immune system and indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) during involution. *Lymphat Res Biol*. 2003;1(4):291-9.

33. Herbert A, Ng H, Jessup W, Kockx M, Cartland S, Thomas SR, Hogg PJ, Wargon O. Hypoxia regulates the production and activity of glucose transporter-1 and indoleamine 2,3-dioxygenase in monocyte-derived endothelial-like cells: possible relevance to infantile haemangioma pathogenesis. *Br J Dermatol*. 2011 Feb;164(2):308-15.

34. Riesenbergr R, Weiler C, Spring O, Eder M, Buchner A, Popp T, Castro M, Kammerer R, Takikawa O, Hatz RA, Stief CG, Hofstetter A, Zimmermann W. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor endothelial cells correlates with long-term survival of patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007 Dec 1;13(23):6993-7002.

35. Batista CE, Juhász C, Muzik O, Kupsky WJ, Barger G, Chugani HT, Mittal S, Sood S, Chakraborty PK, Chugani DC. Imaging correlates of differential expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human brain tumors. *Mol Imaging Biol*. 2009 Nov-Dec;11(6):460-6.

36. Mezrich JD, Nguyen LP, Kennedy G, Nukaya M, Fechner JH, Zhang X, Xing Y, Bradfield CA. SU5416, a VEGF receptor inhibitor and ligand of the AHR, represents a new alternative for immunomodulation. *PLoS One*. 2012;7(9):e44547.

- 37.** Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A: Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014, 64(1):9-29.
- 38.** Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffoux C, Denis L, Newling DW, Kurth K: Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol.* 2006, 49:466–5.
- 39.** Fechner G, Dederichs F, Schmidt D, Müller S, Vaupel P, Albers P. Hyperoxia-induced improvement of the in vitro response to gemcitabine in transitional cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2005 Sep-Oct;25(5):3413-8.
- 40.** Marti LC, Pavon L, Severino P, Sibov T, Guilhen D, Moreira-Filho CA. Vascular endothelial growth factor-A enhances indoleamine 2,3-dioxygenase expression by dendritic cells and subsequently impacts lymphocyte proliferation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014 Feb;109(1):70-9.