

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO  
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM MEDICINA

RODRIGO BARBOSA DE OLIVEIRA BRITO

**ANÁLISE DA INIBIÇÃO DA ENZIMA INDOLEAMINA 2,3 DIOXIGENASE POR 1-METIL  
TRIPTOFANO NA INDUÇÃO TRANSIÇÃO EPITÉLIO MESENQUIMAL EM CÉLULAS  
T24 DE CÂNCER DE BEXIGA HUMANA**

Analysis of the inhibition of the indoleamine 2,3 dioxygenase enzyme by  
1methyl tryptophan in the induction of mesenchimal epithelium transition in  
human bladder cancer T24 cells

SÃO PAULO 2021

UNIVERSIDADE  
NOVE DE JULHO  
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM MEDICINA

RODRIGO BARBOSA DE OLIVEIRA BRITO

**ANÁLISE DA INIBIÇÃO DA ENZIMA INDOLEAMINA 2,3 DIOXIGENASE POR 1-METIL  
TRIPTOFANO NA INDUÇÃO TRANSIÇÃO EPITÉLIO MESENQUIMAL EM CÉLULAS  
T24 DE CÂNCER DE BEXIGA HUMANA**

Analysis of the inhibition of the indoleamine 2,3 dioxygenase enzyme by 1methyl  
tryptophan in the induction of mesenchimal epithelium transition in human  
bladder cancer T24 cells

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

Orientador: Prof. Humberto Dellê.

SÃO PAULO 2021

*Brito, Rodrigo Barbosa de Oliveira.*

*Análise da inibição da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase por 1-metil triptofano na indução transição epitélio mesenquimal em células t24 de câncer de bexiga humana. / Rodrigo Barbosa de Oliveira Brito. 2021.*

*42 f.*

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

*Orientador: Prof. Dr. Humberto Dellê.*

*1. Transição epitélio mesenquimal. 2. Carcinoma de bexiga urinária. 4. Indoleamina 2,3 dioxigenase.*

*I. Dellê, Humberto. III. Título*

**CDU 616**



São Paulo 01 de dezembro de 2021

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluna: **RODRIGO BARBOSA DE OLIVEIRABRITO**

Título da tese: **ANÁLISE DA INIBIÇÃO DA ENZIMA INDOLEAMINA 2,3 – DIOXIGENASI POR 1 – METIL – TRIPTOFANO NA INDUÇÃO DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO – MESENQUIMAL EM CÉLULAS T24 DE CÂNCER DE BEXIGA HUMANO.**

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

*Humberto Dellé*

Membro: PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER \_\_\_\_\_

*Stella Regina Zamuner*

Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS \_\_\_\_\_

*Rodrigo Labat Marcos*

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

*Ana Carolina R. Moreno*

## Resumo

O câncer de bexiga destaca-se pela alta capacidade de recidiva e progressão metastática, relacionada a transição epitélio mesenquimal (EMT). A indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) é uma enzima expressa em diversos tipos de tumores, associada com escape tumoral, devido seus mecanismos imunológicos. Há indícios de que a IDO participe da EMT por meio do TGF-  $\beta$ 1. O 1-metil triptofano (MT), o inibidor químico da IDO, potencializa a EMT em células de câncer de bexiga. Uma possibilidade é que o MT seja capaz de ativar o receptor de hidrocarboneto de arila (AHR), pois o AHR foi relacionado no processo de EMT em outros tipos de câncer. O objetivo do presente estudo é analisar a ativação do AHR em células T24 de carcinoma de bexiga humana por MT, a fim de correlacioná-la com o processo de EMT. Para isso, foi realizado “análise in silico” banco de dados GSE13507 correlacionado a expressão relativa de AHR, CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1. Para a análise “in vitro” as células T24 foram incubadas com TGF-beta1, MT e/ou CH223191, um inibidor do AHR. Os resultados “in silico” foi possível observar alta expressão de CYP1A1 e CYP1A2 associada ao grau histológico, estágio e progressão do tumor. Já na análise “in vitro” os resultados demonstraram que o CH223191 é capaz de inibir a ativação do AHR através da diminuição da expressão de CYP1A1. Porém, a inibição da ativação do AHR é incapaz de impedir a EMT desencadeadas por 1MT e TGFbeta1. Apesar de não ser observado a EMT reversar, não podemos descartar que o AHR esteja relacionado com a potencialização da EMT desencadeada pelo MT, pois encontrar marcadores EMT confiáveis requer uma abordagem combinatória, bem como distinguir entre funções associadas e não associadas a EMT. Concluímos que o MT é capaz de ativar o AHR no câncer de bexiga, sugerindo uma via metabólica que justifica o efeito potencializador do MT na EMT desencadeada pelo TGF-beta1.

**Palavras chaves:** Transição epitélio mesenquimal, Carcinoma de bexiga urinária, Indoleamina 2,3 dioxigenase.

## **Abstract**

Bladder cancer stands out for its high relapse capacity and metastatic progression, related to a mesenchymal epithelial transition (EMT). Indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) is an enzyme expressed in several types of tumors, associated with tumor escape, due to its immunological mechanisms. There is evidence that an IDO participates in EMT through TGF- $\beta$ 1. 1-methyl tryptophan (MT), the chemical inhibitor of IDO, potentiates EMT in bladder cancer cells. One possibility is that MT is able to activate the aryl hydrocarbon receptor (AHR), as AHR has been linked in the EMT process in other cancers. The aim of the present study is to analyze the activation of AHR in human bladder carcinoma T24 cells by MT, in order to correlate it with the EMT process. For this, a "silica analysis" of the GSE13507 database correlated to the relative expression of AHR, CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 was performed. For an "in vitro" analysis how T24 cells will be incubated with TGF-beta1, MT and/or CH223191, an AHR inhibitor. The results "in silico" it was possible to observe high expression of CYP1A1 and CYP1A2 associated with the histological grade, stage and progression of the tumor. In the "in vitro" analysis, the results showed that CH223191 is able to inhibit the activation of the AHR by decreasing the expression of CYP1A1. However, inhibition of AHR activation is unable to prevent EMT triggered by 1MT and TGF-beta1. Although EMT reversal is not observed, we cannot rule out that AHR is related to EMT potentiation triggered by MT, as finding EMT markers requires a combinatorial approach, as well as distinguishing between EMT-associated and non-EMT-associated functions. We conclude that MT is able to activate AHR in bladder cancer, suggesting a metabolic pathway that justifies the potentiating effect of MT on EMT triggered by TGF-beta1.

**Keywords:** Mesenchymal epithelium transition, Urinary bladder carcinoma, Indoleamine 2,3 dioxygenase.

## Lista de Tabelas

**Tabela 1:** Primers utilizados para RT-PCR em tempo real.....23

**Tabela 2:** Associação entre a expressão de AHR e citocromos e as características patológicas de pacientes com câncer de bexiga. Foram extraídos do conjunto de dados GSE13507.....26

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Representação da alteração da morfologia das células antes e depois do processo de EMT.....	12
<b>Figura 02:</b> Diferentes tipos de EMT.....	13
<b>Figura 03:</b> Mecanismo de ativação do AHR por ligantes aerobióticos e endógenos.....	17
<b>Figura 04:</b> Desenho do estudo.....	21
<b>Figura 05:</b> PCR em tempo real para analisar a expressão de CYP1A1.....	27
<b>Figura 06:</b> PCR em tempo real para analisar a expressão de AHR.....	28
<b>Figura 07:</b> PCR em tempo real para analisar a expressão e-caderina.....	29
<b>Figura 08:</b> PCR em tempo real para analisar a expressão de n-caderina.....	30
<b>Figura 09:</b> PCR em tempo real para analisar a expressão de SNAIL.....	31
<b>Figura 10:</b> PCR em tempo real para analisar a expressão de Slug.....	32



## Lista de Abreviaturas

MT - 1-Metil Triptofano

AHR - Receptor de Hidrocarboneto de Arila

ANOVA - Análise de variância

ARNT - Heterodímero com o Translocador Nuclear

BCG - Bacilo Calmette-Guérin

CH - CH223191

CYP1A - Citocromo P450 Família 1 Subfamília A Membro 2

CYP1A1 - Citocromo P450 Família 1 Subfamília A Membro 1

CYP1B1 - Citocromo P450 Família 1 Subfamília B Membro 1

DRE - Elemento Responsivo à Dioxina

ECAD - E-caderina

EMT - Transição Epitélio-Mesenquimal

GEO - Gene Expression Omnibus

IDO - Indoleamina 2,3 Dioxigenase

INCA - Instituto Nacional de Câncer

MET - Transição Mesenquimal- Epitélio

PI3-K - Phosphatidylinositol 3-kinase

TCDD - 2,3,7,8-tetraclorodibenzo- p-dioxina

TGF- $\beta$  - Transforming Growth Fator Beta  $\alpha$ -SMA

- Alfa Actina de Músculo Liso

## Índice

<b>1 Introdução</b> .....	09
1.1 Transição epitélio mesenquimal.....	11
1.2 Indoleamine 2,3 dioxigenase.....	14
1.3 Receptor de hidrocarboneto de arila.....	16
<b>Objetivos</b> .....	19
<b>3 Materiais e Métodos</b> .....	20
3.1 Análise de expressão no banco de dados GEO.....	20
3.2 Cultura celular.....	21
3.3 Extração de RNA.....	22
3.4 Síntese do DNA complementar.....	23
3.5 PCR em tempo real.....	23
3.6 Análises Estatística.....	24
<b>4 Resultados</b> .....	25
4.1 Expressão de AHR e citocromos em pacientes com câncer de bexiga.....	25
4.2 Efeito CH223191 na inibição do AHR em células T24.....	27
4.3 Expressão dos Marcadores de EMT em células T24.....	28
<b>5 Discussão</b> .....	33
<b>6 Conclusão</b> .....	37
<b>7 Referência Bibliográfica</b> .....	38

## 1 Introdução

O câncer é uma das maiores causas de morte no mundo. De acordo com a Sociedade Americana de Câncer, em 2021 nos Estados Unidos estão projetados mais de um milhão e setecentos novos casos de câncer e mais de seiscentos mil mortes. Entre os cânceres destaca-se o câncer de próstata e mama, sendo os mais frequentes entre homens e mulheres, respectivamente<sup>1</sup>.

Ainda com relação ao levantamento realizado pela Sociedade Americana de Câncer, estima-se que em 2019, 61.700 homens e 18.770 mulheres sejam acometidas com câncer de bexiga urinária. O câncer de bexiga é o quarto tumor de maior incidência nos homens, sendo que no decorrer do ano aproximadamente dezessete mil pessoas irão a óbito por cânceres de bexiga urinária no decorrer do ano<sup>2</sup>.

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), tivemos 9.480 casos de o câncer de bexiga em 2018, sendo o sétimo câncer mais comum em homens, e o décimo quarto em mulheres<sup>3</sup>. Alguns fatores como a exposição à produtos químicos, tabagismo e infecções estão relacionados com a incidência e o desenvolvimento do câncer de bexiga<sup>4</sup>.

Embora as terapias anti-neoplásicas para o câncer de bexiga como a ressecção do tumor, a quimioterapia com Mitomicina C, Thiotepa, Doxorubicina e a imunoterapia com o Bacilo Calmette-Guérin (BCG) vem reduzindo a morbimortalidade, mas a mortalidade ainda é alta<sup>5</sup>. Os cânceres urogenitais representam uma grande parcela dos cânceres humanos, destacando-se pela alta capacidade metastática. Os indicadores são alarmantes e reforçam a necessidade de alternativas terapêuticas mais eficazes e marcadores mais

sensíveis para diagnóstico e prognóstico. Os tumores de bexiga são classificados de acordo com a sua capacidade de invasão, como Ta (Tumores que não invadem a musculatura da bexiga), T1 (tumor que invade apenas a submucosa), Tis (carcinoma in situ), T2 (tumor que invade o músculo), T3 (tumor que invade tecido perivesical) e T4 (tumor que invade outras estruturas)<sup>6</sup>.

A transição epitélio-mesenquimal (*EMT, do inglês epithelial mesenchymal transition*) em neoplasias malignas tem sido relacionada com o desenvolvimento e poder metastático do tumor. Ocorrem mudanças complexas na arquitetura tecidual e no comportamento celular, facilitando a disseminação. No processo de EMT, as células epiteliais passam a expressar marcadores mesenquimais, como a vimentina, perdendo a expressão de e-caderina (ECAD), um dos marcadores epiteliais responsáveis pela estabilidade da ligação intercelular e entre célula-matriz extracelular<sup>7</sup>. Esta mudança fenotípica diminui a polaridade das células epiteliais, promovendo a liberação da célula presa à membrana basal, propiciando a invasão. Um dos mecanismos envolvidos nesse processo é através da mediação via TGF- $\beta$  (do inglês, *transforming growth factor beta*), um reconhecido indutor de EMT, influente no processo de metástase<sup>8-9</sup>.

Como uma tentativa de frear a disseminação tumoral, o nosso grupo vem trabalhando para entender o papel da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) no câncer de bexiga, uma vez que células de carcinoma de bexiga humano expressão (IDO), conhecida por seu papel imunomodulador<sup>10</sup>. Vários tumores também expressão a enzima IDO apontando um mecanismo de escape tumoral<sup>11</sup>.

AIDO uma molécula reconhecida como imunomoduladora. Estudos sugerem que aIDO exerça um papel pró-neoplásico, especialmente através de seus efeitos em bloquear o ataque imunológico mediado por células T<sup>12</sup>. Este efeito foi muito bem caracterizado na interface materno fetal, onde a expressão deIDO em trofoblasto protege o tecido embrionário contra o sistema imune materno<sup>13</sup>.

Por outro lado, células T24 de carcinoma de bexiga humana, quando incubadas com o inibidor químico daIDO o 1-Metil Triptofano (MT) e TGF-beta1, são induzidas a EMT, potencializando a disseminação tumoral<sup>10</sup>. Acredita-se que este mecanismo ocorra pelo fato que o MT seja capaz de ativar o receptor de hidrocarboneto de arila (AHR, do inglês *aryl hydrocarbon receptor*) em alguns tipos celulares<sup>14</sup>.

O AHR é um fator de transcrição que transloca-se para o núcleo celular quando é ligado à ligantes xenobióticos e endógenos<sup>15</sup>. O seu papel na EMT é controverso, mas em células A549 de câncer de pulmão a ativação do AHR regula a autofagia, modulando positivamente a EMT<sup>16</sup>

### **1.1 Transição epitélio-mesenquimal (EMT)**

A EMT representa um processo biológico no qual células epiteliais perdem suas características, adquirindo um fenótipo mesenquimal. As modificações que ocorrem durante a EMT em células de câncer, estão associadas com resistência ao tratamento, resistência e apoptose e maior capacidade de invasão em tecidos. Durante a EMT ocorre degradação da membrana basal, favorecendo a migração das células para camadas epiteliais distantes da qual se originou

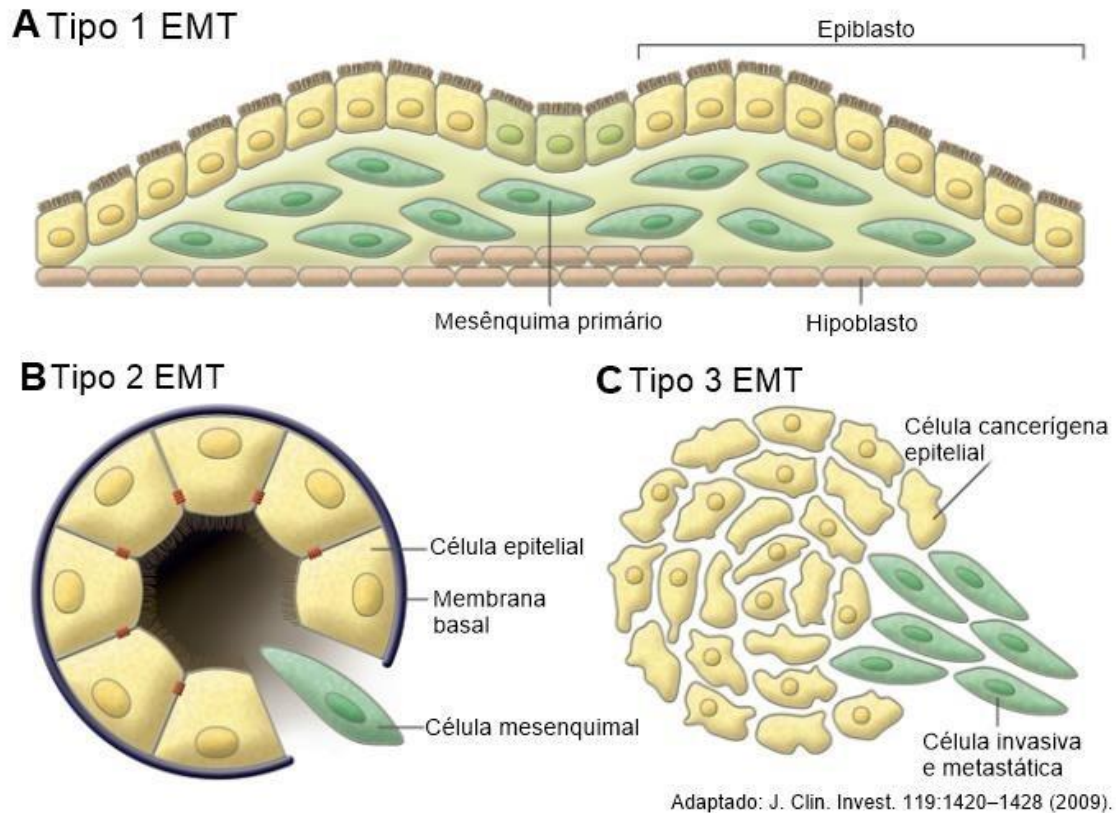
(Figura 1) 17-18-19.



**Figura 1:** Representação da alteração da morfologia das células antes e depois do processo de EMT. Adaptado de Raghu Kalluri e Robert A. Weinberg, 2009.

A EMT resulta de mudanças complexas na regulação de expressão gênica, pois genes que conferem características epiteliais são reprimidos, para que ocorra a modulação positiva de genes mesenquimais. A e-caderina é responsável por promover as junções célula com célula, promovendo polaridade com a membrana basal, limitando a capacidade migratória. Durante a EMT a e-caderina é reprimido pelo fator de transcrição Snail<sup>19</sup>. Em contrapartida, as células com fenótipo mesenquimal passam a expressar marcadores como vimentina, fibronectina e n-caderina, conferindo a capacidade migratória, favorecendo a motilidade celular durante a EMT<sup>17-19</sup>.

A EMT é classificada em três tipos diferentes, o tipo um, ocorre durante o período embrionário, para que ocorra o desenvolvimento dos órgãos. O tipo dois, está associado com o processo inflamatório, ativando os fibroblastos a reconstruir o tecido lesionado. Por fim, o tipo três, ocorre em células tumorais, associado com a progressão tumoral e metástase<sup>19</sup>. (Figura 2)



**Figura 02:** Diferentes tipos de EMT. (A) EMT tipo 1 está associado com implantação embrionária. (B) EMT tipo 2 envolvido no contexto de inflamação e fibrose. (C) EMT tipo 3 envolvida no processo de metástase tumoral. Adaptado de Raghu Kalluri e Robert A. Weinberg, 2009.

Uma das características do tecido epitelial é a plasticidade, a EMT pode sofrer o processo inverso, chamado de transição mesenquimal para epitelial (MET)<sup>20</sup>. A EMT e a MET são mediadas por mudanças transcricionais e são observadas durante o envolvimento embrionário (tipo um), cicatrização tecidual (tipo dois) e na tumorigênese (tipo três)<sup>17</sup>.

Existem vários fatores de transcrição associados com o desenvolvimento da EMT, o Snail e Slug são amplamente estudados, pois estão associados a remodelação da cromatina, regulando negativamente a expressão de E-caderina. O Twist induz a EMT no câncer, associado diretamente à invasão tumoral,

desencadeando a metástase. Expressão do twist reduz a expressão de marcadores epiteliais e aumenta a expressão de marcadores mesenquimais<sup>17</sup>.

O TGF-beta é um importante fator de crescimento e diferenciação de células e tem sido descrito na carcinogênese, especialmente no processo de EMT que acontece durante o desenvolvimento neoplásico metastático<sup>21-22</sup>. Em modelo de carcinoma de pele desenvolvido em camundongos transgênicos, foi possível demonstrar que a ausência de receptor para TGF-beta1 correlacionouse com melhor prognóstico<sup>23</sup>. Neste sentido, em células de carcinoma de bexiga, já foi bem descrito que o TGF-beta1 é capaz de induzir a EMT, relacionando a maior malignidade tumoral<sup>10-24</sup>.

Curiosamente, estudos com células dendríticas demonstram que aIDO pode ser induzida pelo TGF-  $\beta$ 1 através da via de sinalização PI3K/Akt, a mesma via que promove regulação do ciclo celular e desencadeia o processo de EMT em tumores<sup>25</sup>. Esta é uma via extremamente interessante para sugerir a interação entre TGF-beta e IDO na indução da EMT, por isso se faz necessário estudar o efeito da inibição da IDO como o MT em relação a EMT, pois existem estudos clínicos evidenciando a utilização<sup>26</sup>.

## **1.2 Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO)**

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 MT, um inibidor da IDO, causa rejeição do tecido embrionário



em camundongos, mediada por linfócitos T alorreativos<sup>10</sup>. Em estudo subsequente, o mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que macrófagos cultivados “*in vitro*” expressando IDO, inibindo a proliferação de linfócitos T através da depleção de triptofano<sup>12</sup>.

A IDO promove depleção de Triptofano, produzindo metabólitos, 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<sup>27</sup>. Além de inibir a proliferação, os derivados da quinurenina induzem apoptose em linfócitos T “*in vitro*”, além de suprimirem timócitos alorreativos “*in vivo*”<sup>28</sup>.

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<sup>29</sup>. Nota-se que as células de câncer de bexiga urinária expressão IDO de forma constitutiva<sup>30</sup>.

Clinicamente, a expressão de IDO “*in situ*” correlaciona-se com progressão de câncer endometrial, funcionando como marcador para pior prognóstico clínico<sup>31</sup>. Na mesma linha de estudo, a expressão de IDO está correlacionada com diminuição da sobrevida e pior prognóstico para portadores de câncer ovariano<sup>32</sup>. Além disso, a expressão de IDO está presente também em câncer coloretal e está relacionada à metástase hepática e diminuição de linfócitos T<sup>33</sup>.

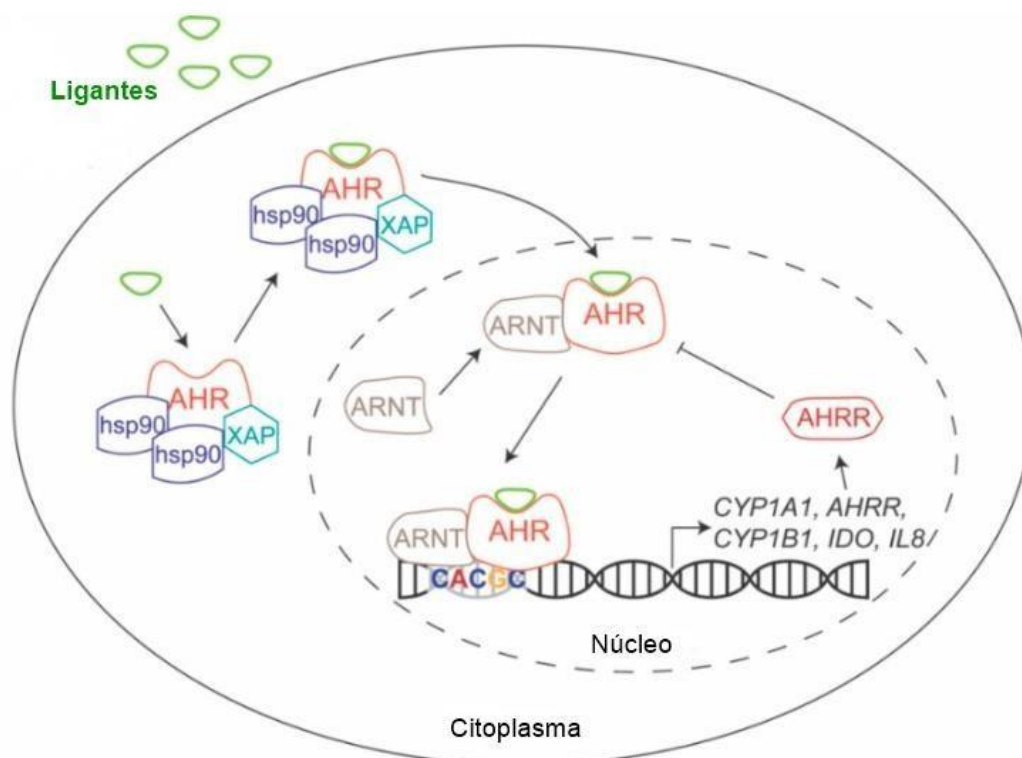
A inibição da IDO com o MT potencializa o efeito de quimioterápicos no melanoma, câncer de próstata, leucemia mieloide aguda, câncer cerebral, adenocarcinoma pancreático e câncer de mama<sup>34</sup>. Curiosamente, no câncer de bexiga o MT potencializou a disseminação tumoral<sup>10</sup>, sugerindo que o MT se ligue em outros receptores, ativando vias metabólicas associadas a progressão do câncer de bexiga. Como hipótese, o MT pode estar associado a ativação do AHR em células de câncer de bexiga como acontece com as células estromais<sup>14</sup>.

### **1.3 Receptor de Hidrocarboneto de Arila (AHR)**

O AHR foi descrito inicialmente como um receptor para o ligante do 2,3,7,8-tetraclorodibenzo- *p*-dioxina (TCDD), um contaminante presente em herbicidas e, em seguida, como ligante de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares<sup>35</sup>. Com o passar dos anos, foi demonstrado que compostos endógenos, incluindo metabólitos de triptofano, flavonoides, indol-3-carbinol e seus metabólitos também são capazes de ativar o receptor<sup>36-37-38</sup>.

Estruturalmente, o AHR é encontrado no citoplasma, ligados a um complexo proteico constituído pela chaperona HSP90 e XAP. Após a ativação do AHR por algum ligante, ocorre alteração conformacional. Dessa forma, as proteínas que envolvem o AHR no citoplasma dissociam, ocorrendo a sua translocação para o núcleo, local que ocorre a formação do heterodímero com o translocador nuclear de AHR (ARNT). O heterodímero reconhece o elemento responsivo à dioxina (DRE) o qual possui a sequência (5'-CACGC-3'), descrita como região promotora que é capaz de induzir a transcrição de genes alvos com o CYP1A1 em diversos tipos celulares<sup>39</sup>. (Figura 03)

O AHR funciona como um fator pró-tumoral, modulando diretamente a invasão de células cancerosas<sup>40</sup>, regulando genes, incluindo Citocromo P450 Família 1 Subfamília A Membro 1 (CYP1A1), Citocromo P450 Família 1 Subfamília A Membro 2 (CYP1A2), Citocromo P450 Família 1 Subfamília B Membro 1 (CYP1B1).<sup>36</sup> O CYP1A1 metaboliza vários pró-carcinógenos, como o benzo(a)pireno, em intermediários que podem reagir com o DNA, resultando em mutagênese. O CYP1B1 no glioblastoma regula produção de altos níveis de quinurenina, associado a progressão do câncer. O CYP1A2 no rim, relaciona maior o risco de câncer após o transplante renal<sup>39</sup>.



Adaptado: Drew R. Neavin, et al. Int J Mol Sci. 2018 Dec;19(12):3851.

**Figura 03:** Mecanismo de ativação do AHR por ligantes aerobióticos e endógenos. Adaptado de Drew R. Neavin et al 2018.

A partir da descoberta do AHR, os pesquisadores descreveram moléculas antagonista, que se ligam ao AHR, mas impedem a ativação. Duas das moléculas

descritas são 7-Ketocholesterol e CH223191, que se ligam ao AHR. Essas moléculas podem impedir a translocação nuclear, uma vez que, inibem a atividade de transcrição do receptor, podendo ser utilizado para compreender o papel do AHR na sinalização celular<sup>41-42</sup>.

Atualmente, estudos tem demonstrado a relação do AHR no câncer<sup>39</sup>, de fato, o AHR é apontado como um mediador da sobrevivência e motilidade de células de glioblastoma<sup>43</sup>. É provável que este receptor esteja envolvido em vários estágios da progressão do câncer, incluindo o início de células cancerígenas, invasão tumoral e metástase. No câncer hepatocelular, existem evidências que mostra a ativação do AHR regulando a sinalização de TGF-beta, desencadeando a EMT<sup>44</sup>.

AIDO está relacionada a ativação do AHR, pois a L-quinurenina, um dos metabólitos de triptofano, liga-se ao AHR induzindo EMT em células de câncer de pulmão<sup>45</sup>. Porém, em células estromais, o inibidor químico daIDO também se mostrou eficaz na ativação do AHR<sup>14</sup>. O que nos leva a hipótese de que o MT ative o AHR em célula de câncer de bexiga humana, o qual potencializa a EMT induzida por TGF-beta1.

Considerando que o MT está sendo amplamente utilizado em ensaios clínicos relacionados a tumores, com o objetivo de esgotar a atividade da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e a via da quinurenina, impedido o escape imunológico tumoral.<sup>46</sup> Este estudo se faz importante para apontar os riscos da utilização do MT no câncer de bexiga.

## 2 Objetivos

O objetivo do presente estudo é analisar a ativação do AHR em câncer de bexiga humana por MT, a fim de correlacioná-la com o processo de EMT.

Mais especificamente, os objetivos são:

- Analisar “in silico” do banco de dados GSE13507 para correlacionar a expressão de AHR, CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1 com o grau e progressão tumoral.
- Avaliar as células T24 estimuladas com TGF-beta1 e 1-metil triptofano e avaliar expressão de CYP1A1.
- Avaliar a inibição do AHR utilizando CH223191, em células T24 estimuladas com TGF-beta1 e 1-metil triptofano e verificar a EMT através da expressão de e-caderina, n-caderina, snail e slug.

### 3 Materias e Métodos

#### 3.1 Análise de expressão no banco de dados GEO

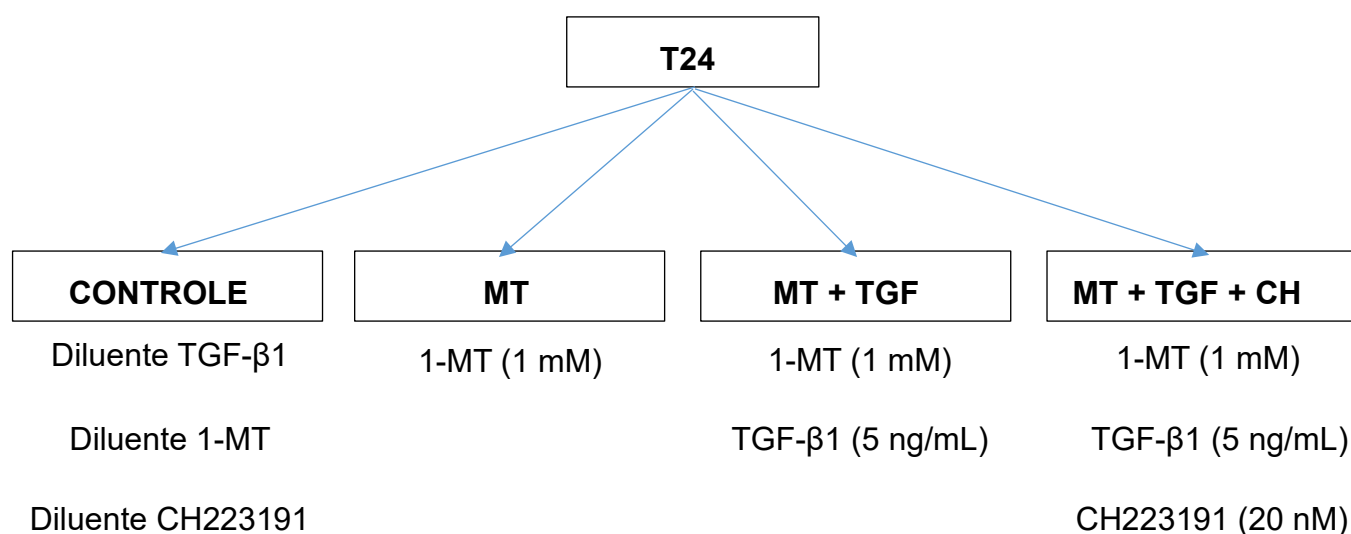
O Banco de dados Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) foram explorados para obter dados de pacientes com câncer de bexiga<sup>47</sup>. Além do microarray, dados de grau, estágio e progressão do tumor eram necessários. A série GSE13507 foi selecionada, fornecendo dados de 165 pacientes com carcinoma de células transicionais. Todas as informações sobre os pacientes e suas amostras foram coletadas dos estudos que deram origem à série GSE13507, Lee e colaboradores<sup>48</sup> e Kim e colaboradores<sup>49</sup>. Os tumores foram testados e classificados de acordo com o American Joint Committee on Cancer. De todos os 165, 103 foram histologicamente diagnosticados com câncer de bexiga músculo não invasivo (Ta, n = 23; T1, n = 80) e 62 com câncer de bexiga músculo invasivo (T2, n = 32; T3, n = 19; T4, n = 11). Metastática foi detectada em 13 casos de invasão muscular (T2, n = 5; T3, n = 5; T4, n = 3). Os espécimes foram obtidos de ressecção transuretral de tumor de bexiga (para tumores superficiais) ou de cistectomia (para tumores músculo invasivos). A progressão foi definida como a progressão do estágio após a recidiva da doença em tumores músculo não invasivos do e tumores músculo invasivos. GEO2R, uma ferramenta da web baseada em R usada para analisar dados GEO, foi usada para obter valores de expressão relativa de AHR, CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1. Para separar os pacientes entre os dois grupos (baixa e alta expressão dos genes alvo), um ponto de corte foi determinado para cada gene com base na mediana ou curva ROC que prevê a progressão do tumor. A análise de correlação foi realizada

confrontando a expressão relativa dos genes-alvo com características clínicopatológicas (sexo, idade, grau do tumor, estágio e progressão).

### 3.2 Cultura celular

Foram utilizadas células humanas T24 de carcinoma de bexiga, adquiridas comercialmente do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Associação Técnico Científica Paul Ehrlich). As células foram mantidas em cultura com meio McCoy (Sigma-Aldrich), suplementado com soro fetal bovino 10% e antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100mg/ml), a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>.

Para o estímulo, as células foram semeadas em placas de 06 poços, ao atingirem confluência de aproximadamente 75%, foram incubadas em triplicata com TGF- $\beta$ 1 5 ng/ml (R&D Systems, EUA), MT 1 mM (catálogo 452483, SigmaAldrich, San Diego, USA), inibidor da IDO e/ou CH223191 20 nM (sigma-Aldrich, San Diego, USA), Inibidor do AHR, por 48 horas, a fim de detectar se a inibição do AHR irá modular EMT, avaliada pela expressão de e-caderina e n-caderina por PCR em tempo real.



**Figura 04:** Desenho do estudo “in vitro”.

### **3.3 Extração de RNA**

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

### **3.4 Síntese do DNA complementar (cDNA)**

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

### **3.5 PCR em tempo real**

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



(Ct) foi determinado para o gene de manutenção (TBP), bem como genes alvo usando a linha de base automática e as condições de limite automático. Dados de expressão gênica normalizados, usando  $\Delta\Delta Ct$  ( $\Delta Ct$  referência-  $\Delta Ct$  alvo) e a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , foram utilizadas para análises posteriores.

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.

Os primers que foram usados neste estudo estão apresentados na tabela 1. Como *housekeeping*, estamos utilizando o TBP (TATA box binding protein), pois estudo previamente publicado demonstrou ser um excelente *housekeeping* para carcinoma de bexiga urinária.<sup>37</sup>

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

Gene alvo	Primer forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
TBP	TTCGGAGAGTTCTGGGATTGTA	TGGACTGTTCTTCACTCTTGGC
E-cadherina	ACGTCGTAATCACCACACTGA	TTCGTCACTGCTACGTGTAGAA
N-cadherina	TGCCCGTTTTCATTTAGGGG	TCCTCAGGAACTGTCCAT
SLUG	TGTTGCAGTGAGGGCAAGAA	GACCCTTGCTTCAAGGA
SNAIL	ACCACTATGCCGCGCTCTT	GGTCGTAGGGCTGGAA
CYP1A1	ACATCACCTACGCCAGTCGC	TCTATGCCGCTTGAAGGAT

### 3.6 Análise estatística

Os dados dos conjuntos de dados GEO foram apresentados como mediana com valores máximos e mínimos ou média e desvio padrão. O teste de

Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a distribuição da amostra. A análise das variáveis nominais ou categorizadas foi realizada por meio do teste do quiquadrado. Para categorizar uma variável contínua ou ordinal, usamos o melhor ponto de corte estabelecido usando uma curva ROC e o índice de Youden. Para os dados in vitro, foram representados pela média  $\pm$  erro padrão. Para a comparação entre os grupos, utilizaremos o teste T para análises que envolvam 2 grupos ou o teste de ANOVA com correção de Bonferroni para análises que tenham mais de 2 grupos. A significância estatística será considerada a partir do  $p < 0,05$ .

## **4 Resultados**

### **4.1 Expressão de AHR e citocromos em pacientes com câncer de bexiga**

O banco de dados GSE13507 forneceu dados de expressão gênica de biópsias de tumores de 165 pacientes com câncer de bexiga. A população foi separada em baixa e alta expressão de AHR, CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1. De acordo com a Tabela 1, não foi observada correlação entre a expressão do AHR e os parâmetros relacionados à progressão tumoral. No entanto, a alta expressão de CYP1A1 e CYP1A2 foi associada ao grau histológico, estágio do tumor e progressão. A expressão do CYP1B1 foi associada ao estágio e progressão do tumor, mas não ao grau histológico ( $p = 0,375$ ).

**Tabela 2.** Associação entre a expressão de AHR e citocromos e as características patológicas de pacientes com câncer de bexiga. Foram extraídos do conjunto de dados GSE13507.

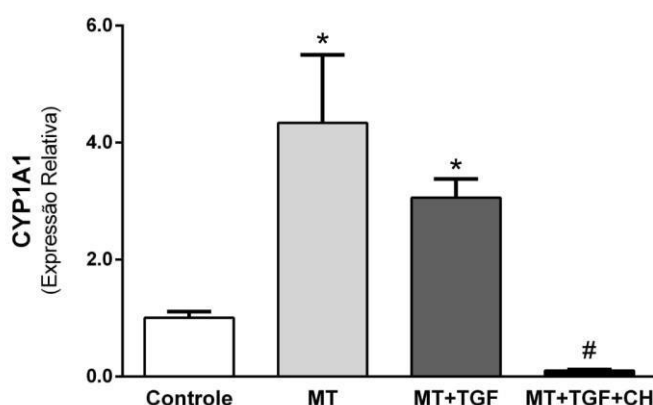
Parâmetros	n	AHR		P	CYP1A1		P	CYP1A2		P	CYP1B1		P
		Baixo (%)	Alto (%)		Baixo (%)	Alto (%)		Baixo (%)	Alto (%)		Baixo (%)	Alto (%)	
<b>Gênero</b>													
Feminino	30	05 (16,7)	25 (83,3)	0,149	26 (86,7)	4 (13,3)	0,079	27 (90,0)	03 (10,0)	0,525	21 (70,0)	09 (30,0)	0,060
Masculino	135	40 (29,6)	95 (70,4)		96 (71,1)	39 (28,9)		126 (93,3)	(6,7)		69 (51,1)	66 (48,9)	
<b>Idade</b>													
≤65	69	18 (26,1)	51 (73,9)	0,772	50 (72,5)	19 (27,5)	0,714	66 (95,7)	03 (4,3)	0,220	30 (43,5)	39 (56,5)	0,016*
>65	96	27 (28,1)	69 (71,9)		72 (75,0)	24 (27,5)		87 (90,6)	09 (9,4)		60 (62,5)	36 (37,5)	
<b>Grau histo.</b>													
Baixo	105	31 (29,5)	74 (70,5)	0,390	83 (79,0)	22 (21,0)	0,048*	101 (96,2)	04 (3,8)	0,023*	60 (57,1)	45 (42,9)	0,375
Alto	60	14 (23,3)	46 (76,7)		39 (65,0)	21 (35,0)		(86,7)	08 (13,3)		30 (50,0)	30 (50,0)	
<b>Estágio</b>													
Ta-T1	104	32 (30,8)	72 (69,2)	0,188	94 (90,4)	10 (9,6)	0,005*	100 (96,2)	04 (3,8)	0,027*	65 (62,5)	39 (37,5)	0,007*
>T2	61	13 (21,3)	48 (78,7)		45 (73,8)	16 (26,2)		(86,9)	08 (13,1)		25 (41,0)	36 (59,0)	
<b>Progressão</b>													
Nao	134	40 (29,9)	94 (70,1)	0,122	104 (77,6)	30 (22,4)	0,025*	127 (94,8)	07 (5,2)	0,035*	81 (60,4)	53 (39,6)	0,002*
Sim	31	05 (16,1)	26 (83,9)		(58,1)	13 (41,9)		(83,9)	05 (16,1)		09 (29,0)	22 (71,0)	

Todos os dados foram analisados pelo teste  $\chi^2$ . Os grupos Baixo e Alto foram definidos usando um ponto de corte (curva ROC) para a expressão de AHR,

CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1, independentemente. Grau histo, grau histológico; n, número de pacientes com câncer de bexiga dividido por parâmetros; \* p <0,05.

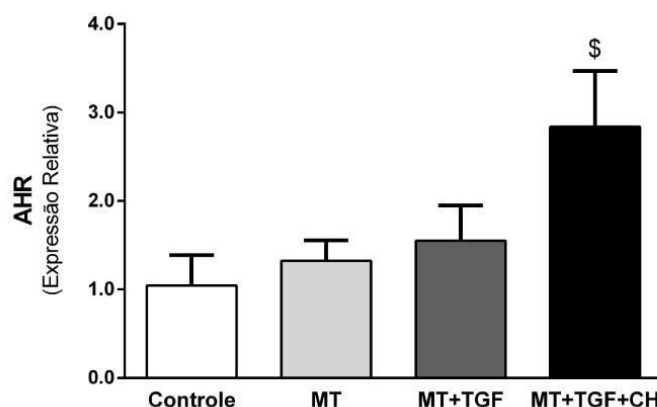
## 4.2 Efeito CH223191 na inibição do AHR em células T24

O MT, inibidor químico da IDO, foi capaz de ativar o AHR em células T24 de carcinoma de bexiga humana, ativação essa evidenciada pela expressão de CYP1A1 (expressão relativa  $4,33 \pm 0,67$  em MT vs.  $1,00 \pm 0,06$  no Controle;  $p < 0,05$ ). O CH223191, inibidor do AHR, foi capaz de impedir a ativação do mesmo através do MT em células T24. (expressão relativa  $0,10 \pm 0,01$  em MT+TGF+CH vs.  $4,33 \pm 0,06$  no MT;  $p < 0,05$ ) (Figura 04).



**Figura 05:** PCR em tempo real para analisar a expressão de CYP1A1. Células T24 foram divididas em 04 grupos: Controle contendo diluentes, MT incubado 1-metil triptofano 1 mM, MT+TGF incubado de forma simultânea com incubado 1-metil triptofano 1 mM e TGF- $\beta$ 1 5 ng/ml, MT+TGF+CH incubado de forma simultânea com incubado 1-metil triptofano 1 mM, TGF- $\beta$ 1 5 ng/ml e CH223191 20 nM. Todos os grupos foram incubados por 48 horas. Observa-se que a redução da expressão de CYP1A1 após a incubação do CH223191. \* $p < 0,05$  vs. Controle, # $p < 0,05$  vs. MT e MT+TGF.

O inibidor CH223191 foi capaz de promover um aumento significativo da expressão do AHR (expressão relativa  $2,83 \pm 0,36$  em MT+TGF+CH vs  $1,04 \pm 0,19$  no controle;  $p < 0,05$ ). O MT e TGF-beta1 não foram capazes de modular a expressão do AHR (Figura 05).

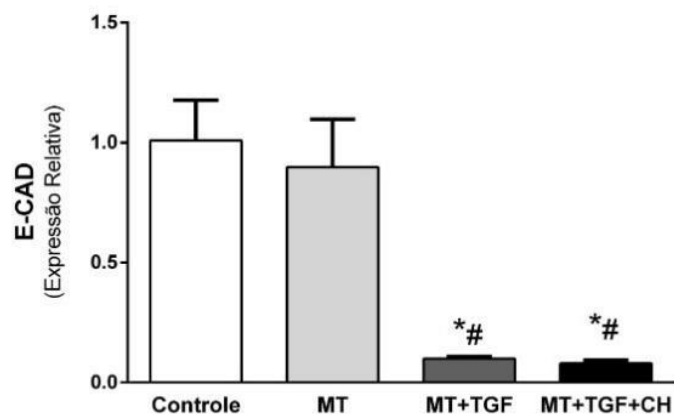


**Figura 06:** PCR em tempo real para analisar a expressão de AHR. Células T24 foram divididas em 04 grupos: Controle contendo diluentes, MT incubado 1-metil triptofano 1 mM, MT+TGF incubado de forma simultânea com incubado 1-metil triptofano 1 mM e TGF- $\beta$ 1 5 ng/ml, MT+TGF+CH incubado de forma simultânea com incubado 1-metil triptofano 1 mM, TGF- $\beta$ 1 5 ng/ml e CH223191 20 nM. Todos os grupos foram incubados por 48 horas. Observa-se que CH223191 aumenta a expressão do AHR em células T24 de câncer de bexiga. \$ $p < 0,05$  vs. Todos grupos.

#### 4.3 Expressão dos Marcadores de EMT em células T24

Com relação aos marcadores de EMT, foi possível detectar uma diminuição da expressão de e-caderina após a incubação das células com 1- MT e TGF-beta1 (expressão relativa  $0,10 \pm 0,01$  em MT+TGF vs.  $1,00 \pm 0,09$  no controle;  $p < 0,05$ ), porém a inibição do AHR com o CH223191 não se mostrou eficaz para restabelecer a expressão basal de e-caderina em células T24

(expressão relativa  $0,08 \pm 0,01$  em MT+TGF+CH vs.  $1,00 \pm 0,09$  no Controle;  $p < 0,05$ ) (Figura 06).

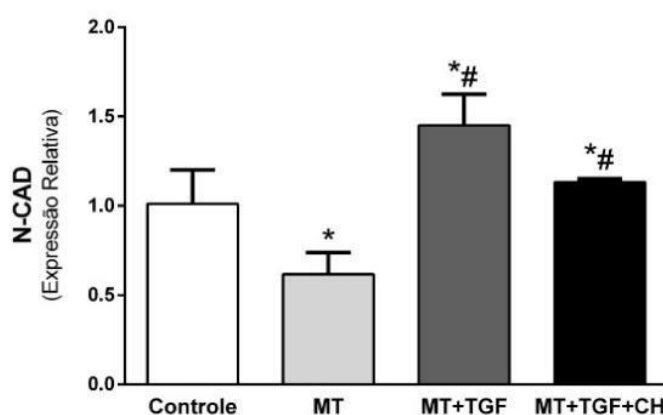


**Figura 07:** PCR em tempo real para analisar a expressão e-caderina. Células T24 foram divididas em 04 grupos: Controle contendo diluentes, MT incubado 1metil triptofano 1 mM, MT+TGF incubado de forma simultânea com incubado 1metil triptofano 1 mM e TGF- $\beta$ 1 5 ng/ml, MT+TGF+CH incubado de forma simultânea com incubado 1-metil triptofano 1 mM, TGF- $\beta$ 1 5 ng/ml e CH223191 20 nM. Todos os grupos foram incubados por 48 horas. A associação de MT e TGF- $\beta$ 1 potencializou EMT em células T24, diminuindo a expressão de e-caderina. Porém, a inibição do AHR com o CH223191 (CH) não foi capaz estabilizar a expressão basal de e-caderina. \* $p < 0,05$  vs. Controle, # $p < 0,05$  vs. MT.

A expressão de n-caderina aumentou após a incubação das células com MT e TGF-beta1 (expressão relativa  $1,4 \pm 0,10$  em MT+TGF vs.  $1,01 \pm 0,10$  no controle  $p < 0,05$ ), porém, a inibição do AHR com o inibidor CH223191 não se mostrou eficaz na redução da expressão (expressão relativa  $1,13 \pm 0,01$  em

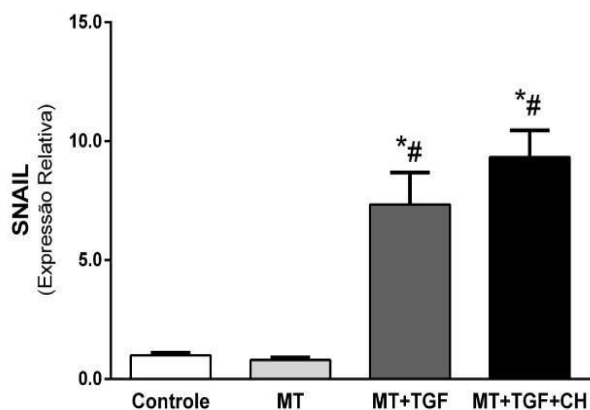


MT+TGF+CH vs.  $1,01 \pm 0,10$  no controle  $p < 0,05$ ) (Figura 07).



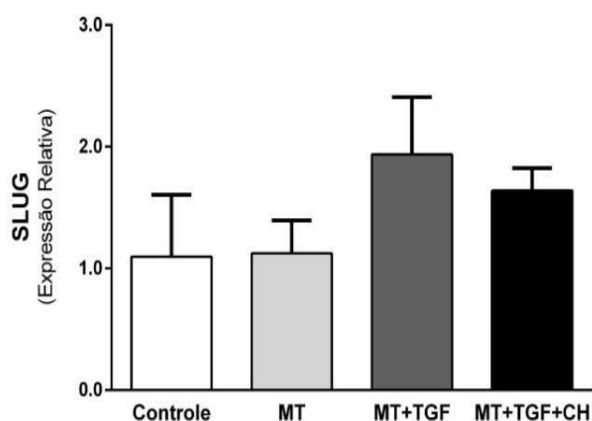
**Figura 08:** PCR em tempo real para analisar a expressão de n-caderina. Células T24 foram divididas em 04 grupos: Controle contendo diluentes, MT incubado 1-metil triptofano 1 mM, MT+TGF incubado de forma simultânea com incubado 1-metil triptofano 1 mM e TGF- $\beta$ 1 5 ng/ml, MT+TGF+CH incubado de forma simultânea com incubado 1-metil triptofano 1 mM, TGF- $\beta$ 1 5 ng/ml e CH223191 20 nM. Todos os grupos foram incubados por 48 horas. A associação de MT e TGF- $\beta$ 1 potencializou EMT em células T24, aumentando a expressão de n-caderina. Porém, a inibição do AHR com o CH223191 (CH) não foi capaz de reduzir a expressão de n-caderina. \* $p < 0,05$  vs. Controle, # $p < 0,05$  vs. MT.

Além disso, foi analisada a expressão de fatores de transcrição relacionados à EMT. A PCR em tempo real revelou que houve aumento da expressão do fator Snail em células T24 estimuladas com 1MT e TGF-beta1 (expressão relativa  $7,33 \pm 0,77$  em MT+TGF+CH vs.  $1,00 \pm 0,05$  no controle;  $p < 0,05$ ), porém a inibição do AHR com o inibidor CH223191 não se mostrou eficaz na redução da EMT (expressão relativa  $9,33 \pm 0,65$  em MT+TGF+CH vs.  $1,00 \pm 0,05$  no controle;  $p < 0,05$ ) (Figura 08).



**Figura 09:** PCR em tempo real para analisar a expressão de SNAIL. Células T24 foram divididas em 04 grupos: Controle contendo diluentes, MT incubado 1-metil triptofano 1 mM, MT+TGF incubado de forma simultânea com incubado 1-metil triptofano 1 mM e TGF- $\beta$ 1 5 ng/ml, MT+TGF+CH incubado de forma simultânea com incubado 1-metil triptofano 1 mM, TGF- $\beta$ 1 5 ng/ml e CH223191 20 nM. Todos os grupos foram incubados por 48 horas. A associação de MT e TGF- $\beta$ 1 potencializou EMT em células T24, aumentando a expressão de Snail, um fator de transcrição associados a EMT. Porém, a inibição do AHR com o CH223191 (CH) não foi capaz de reduzir a expressão Snail. \* $p < 0,05$  vs. Controle, # $p < 0,05$  vs. MT.

Não foi observada diferença significativa em relação a Slug entre os grupos (Expressão relativa  $1,64 \pm 0,10$  em MT+TGF+CH vs.  $1,09 \pm 0,29$  no controle (Figura 09).



**Figura 10:** PCR em tempo real para analisar a expressão de Slug. Células T24 foram divididas em 04 grupos: Controle contendo diluentes, MT incubado 1-metil triptofano 1 mM, MT+TGF incubado de forma simultânea com incubado 1-metil triptofano 1 mM e TGF- $\beta$ 1 5 ng/ml, MT+TGF+CH incubado de forma simultânea com incubado 1-metil triptofano 1 mM, TGF- $\beta$ 1 5 ng/ml e CH223191 20 nM. Todos os grupos foram incubados por 48 horas. Não foi observado diferença significativa entre os grupos em relação ao fator de transcrição associado a EMT Slug.

## 5 Discussão

A IDO tem sido considerada alvo interessante na terapia contra o câncer, pois está associada ao escape imunológico em diversos tipos de tumores, tornando-a objeto de diversos estudos clínicos<sup>46</sup>. A IDO é conhecida por ser uma enzima imunomoduladora, pois promove a depleção do aminoácido triptofano, gerando metabólitos derivados da quinurenina, que são descritos como indutores de apoptose em linfócitos T<sup>12</sup>.

O câncer de bexiga representam uma grande parcela dos cânceres humanos, destacando-se por sua alta capacidade metastática<sup>50</sup>. Células T24 de câncer de bexiga, expressão IDO de forma constitutiva, apontando a necessidade de estudar o papel da IDO no câncer de bexiga, com o intuito de frear o desenvolvimento tumoral<sup>10</sup>. Estudos com células dendríticas demonstram que o TGF-beta, um importante fator de crescimento celular associado à carcinogênese, é capaz de induzir a expressão de IDO através da via de sinalização PI3k/AKT, a mesma via que o TGF-beta, desencadeia a EMT em células tumorais<sup>27</sup>. Este estudo sugere uma relação com o TGF-beta, IDO e EMT na progressão tumoral.

A EMT, é um processo no qual as células epiteliais adquirem um fenótipo invasivo, levando à disseminação sistêmica das células malignas. Durante a EMT, genes específicos são expressos e, em última análise, funcionam para desregular as vias bioquímicas intracelulares, o que contribui para o estabelecimento de um fenótipo maligno. Em nosso estudo, avaliamos o processo de diminuição da expressão de E-caderina seguida de aumento da expressão de N-caderina, um processo denominado “troca de caderina”, para

caracterizar a EMT em células T24<sup>7</sup>. A EMT desempenha um papel importante no câncer de bexiga, onde a motilidade, a invasão e os mecanismos antiapoptóticos são necessários para a metástase<sup>51</sup>.

Fomos investigar o papel daIDO na progressão e disseminação do câncer, particularmente na EMT. Induzimos a EMT em células T24 com TGF- $\beta$ 1, e esse efeito se correlaciona com a regulação negativa deIDO. Porém, quando utilizamos MT, o inibidor daIDO, a EMT foi potencializada nas células T24, sugerindo com que MT seja capaz de ativar diferentes vias metabólicas para potencializar a EMT<sup>10</sup>.

O MT liga-se no AHR em células estromais<sup>14</sup>. O AHR tem sido relacionado não apenas ao início da tumorigênese, mas também à promoção, progressão e metástase<sup>39</sup>. No câncer de bexiga, o AHR tem sido apontado como um potencial indutor de carcinogênese<sup>52</sup>. Nossos resultados apontam que no câncer de bexiga o MT é capaz ativa o AHR.

Analisando a expressão de AHR em tumores e bexiga e na linhagem células T24, foi possível nota que não houve modulação da expressão do gene. Porem após ativação do AHR, há aumento da expressão de citocromos está associa ao grau histológico, estágio do tumor e progressão. A associação entre a ativação do AHR, ativando os citocromos já é observado em alguns tipos de tumores<sup>43</sup>. Sugerindo que no câncer de bexiga, apenas a ativação do AHR contribua para a progressão tumoral, independente do aumento de expressão genica do AHR.

Explorando o desencadeamento da EMT, a ativação do AHR está associada como perda de adesão celular<sup>39</sup>. No carcinoma hepatocelular a EMT

é induzida pela ativação do AHR por quinurenina<sup>53</sup>. Há relação direta a ativação do AHR pela ligação com ligantes aerobióticos e endógenos com o desencadeamento da EMT<sup>16</sup>. O que sugere que no câncer de bexiga a ativação do AHR desencadeei a EMT.

O MT é um dos ligante que conseguem ativar no AHR, como já foi bem demonstrado em células estromais<sup>14</sup>. Nota-se que em células T24 o MT também é capaz de ativar o AHR, aumentando a expressão de CYP1A1. Esses dados sugerem que exista uma participação direta do AHR na EMT potencializada pelo MT.

A inibição do AHR utilizando o CH223191, não conseguiu reverter a EMT desencadeada por TGF-beta e o MT, analisada pelos marcadores e-caderina, ncaderina e Snail. Esperávamos que a inibição do AHR gerasse mudanças recíprocas no fenótipo celular, induzidos por EMT reversa, durante os quais células semelhantes ao mesenquimal pudessem adquirir polaridade apicalbasal, reorganizar seu citoesqueleto e exibir aumento adesão célula-célula, resultando em um epitélio organizado.

É possível que exista diferença na ativação do processo de EMT entre diferentes tipos celulares, já que a EMT pode ser influenciada por diferentes vias de sinalização. Uma importante limitação do nosso estudo é que usamos apenas uma linhagem de câncer de bexiga. Se os eventos encontrados em células T24 forem reproduzidos em outras linhagens de câncer de bexiga, é provável que realmente o AHR não tenha influência sobre a EMT em tumores vesicais. Devido à instabilidade genômica que ocorre nas neoplasias, é possível que as respostas sejam diferentes, mesmo tratando-se do mesmo tipo tumoral.

Apesar de não ser observado a EMT reverter, não podemos descartar que o AHR esteja relacionado com a potencialização da EMT desencadeada pelo MT, pois encontrar marcadores EMT confiáveis requer uma abordagem combinatória, bem como distinguir entre funções associadas e não associadas a EMT. Analisando o estado de uma célula que está envolvida em EMT muitas vezes requer o uso de marcadores que são específicos para um contexto biológico específico<sup>54</sup>.

## 6 Conclusão

Através dos resultados apresentados neste estudo, podemos concluir o MT promove a ativação de AHR em células de câncer de bexiga. A ativação do AHR modula a expressão de citocromos como CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1, relacionando-as a progressão tumoral. Não foi possível observar redução dos genes associados a EMT em relação a inibição do AHR, porém não descarta a hipótese de que o MT potencialize a EMT por esta via metabólica.



## 7 Referências bibliográficas

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(1):7–33.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019: {Cancer} {Statistics}, 2019. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2019;69(1):7–34. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21551>
3. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa Incidência de Câncer no Brasil - Biênio 2018-2019. Vol. 1, Inca. 2018. 124 p.
4. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F, et al. Bladder Cancer Incidence and Mortality : A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol* [Internet]. 2017;71(1):96–108. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2016.06.010>
5. Kamat AM, Lamm DL. Current trends in intravesical therapy for bladder cancer. *Contemp Urol* [Internet]. 2000;12(8):64-64–5, 71–4, 79-80 passim. Available from: [https://www.goldjournal.net/article/S0090-4295\(99\)00463X/pdf%0Ahttp://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cin20&AN=2002113659&site=ehost-live](https://www.goldjournal.net/article/S0090-4295(99)00463X/pdf%0Ahttp://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cin20&AN=2002113659&site=ehost-live)
6. Bladder C, Be C, Early F, Signs BC, Stages BC, To Q, et al. Bladder Cancer Early Detection , Diagnosis , and Staging Can Bladder Cancer Be Found Early ? :1–24.
7. Liu H, Zhang X, Li J, Sun B, Qian H, Yin Z. The biological and clinical importance of epithelial–mesenchymal transition in circulating tumor cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014;141(2):189–201.
8. Singh M, Yelle N, Venugopal C, Singh SK. EMT: Mechanisms and therapeutic implications. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2018;182:80–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.08.009>
9. Li C, Chu P, Yiang G, Wu M. The Molecular Mechanism of Epithelial – Mesenchymal Transition for Breast Carcinogenesis.
10. Brito RBO, Malta C, Motasouza D, Henrique L, Matheus G, Matos YST, et al. 1-methyl-D-tryptophan potentiates TGF- $\beta$ -induced epithelialmesenchymal transition in T24 human bladder cancer cells. *PLoS One.* 2015;10(8):1–16.
11. Godin-Ethier J, Hanafi LA, Piccirillo CA, Lapointe R. Indoleamine 2,3dioxygenase expression in human cancers: Clinical and immunologic perspectives. *Clin Cancer Res.* 2011;17(22):6985–91.
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.* 1999;189(9):1363–72.

13. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* (80- ). 1998;281(5380):1191–3.
14. Lewis HC, Chinnadurai R, Bosinger SE, Galipeau J. The IDO inhibitor 1methyl tryptophan activates the aryl hydrocarbon receptor response in mesenchymal stromal cells. *Oncotarget*. 2017;8(54):91914–27.
15. Transl J, Zhao H, Chen L, Yang T, Feng YL, Vaziri ND, et al. Aryl hydrocarbon receptor activation mediates kidney disease and renal cell carcinoma. *J Transl Med* [Internet]. 2019;2:1–14. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2054-5>
16. Tsai CH, Li CH, Cheng YW, Lee CC, Liao PL, Lin CH, et al. The inhibition of lung cancer cell migration by AhR-regulated autophagy. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(May 2016):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep41927>
17. Georgakopoulos-Soares I, Chartoumpakis D V., Kyriazopoulou V, Zaravinos A. EMT Factors and Metabolic Pathways in Cancer. *Front Oncol*. 2020;10(April):1–20.
18. Ackland ML, Newgreen DF, Fridman M, Waltham MC, Arvanitis A, Minichiello J, et al. Epidermal growth factor-induced epitheliomesenchymal transition in human breast carcinoma cells. *Lab Investig*. 2003;83(3):435–48.
19. Raghu Kalluri<sup>1 2</sup> and Robert A. Weinberg<sup>3</sup>. The basics of epithelialmesenchymal transition. *J Clin Invest* [Internet]. 2009;119. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2689101/pdf/JCI39104.pdf>
20. Thiery JP. EPITHELIAL – MESENCHYMAL TRANSITIONS IN TUMOUR PROGRESSION. 2002;2(June):442–54.
21. Bierie B, Moses HL. Tumour microenvironment - TGFB: The molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(7):506–20.
22. Seoane J, Gomis RR. TGF- $\beta$  family signaling in tumor suppression and cancer progression. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(12):117–29.
23. Cui W, Fowles DJ, Bryson S, Duffie E, Ireland H, Balmain A, et al. TGF $\beta$ 1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell*. 1996;86(4):531–42.
24. Lu X, Duan L, Zhang J, Zeng Z, Kuang R. Fibroblasts from pBOO promote tumorigenesis by secreting TGF $\beta$ 1 to induce EMT in bladder urothelial carcinoma cells. *Biosci Rep*. 2018;BSR20170944.
25. Belladonna ML, Orabona C, Grohmann U, Puccetti P. TGF- $\beta$  and kynurenines as the key to infectious tolerance. *Trends Mol Med*. 2009;15(2):41–9.
26. Yentz S, Smith D. Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) Inhibition as a Strategy to Augment Cancer Immunotherapy. *BioDrugs* [Internet].

- 2018;32(4):311–7. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40259-0180291-4>
27. 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.
  28. Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ*. 2002;9(10):1069–77.
  29. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*. 2003;9(10):1269–74.
  30. Byrne GI, Lehmann LK, Landry GJ. Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells. *Infect Immun*. 1986;53(2):347–51.
  31. Yang J, Weinberg RA. Review Epithelial-Mesenchymal Transition : At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. 2008;
  32. Dutsch-wicherek M. RCAS1 , MT , and Vimentin as Potential Markers of Tumor Microenvironment Remodeling. 2009;181–8.
  33. Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, Schneeberger S, Obrist P, Winkler C, et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: Effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Res*. 2006;12(4):1144–51.
  34. Fox E, Oliver T, Rowe M, Thomas S, Zakharia Y, Gilman PB, et al. Indoximod: An immunometabolic adjuvant that empowers T cell activity in cancer. *Front Oncol*. 2018;8(SEP).
  35. Id KO, Swigonska S, Sadowska A, Ruszkowska M, Nynca A, Molcan T, et al. Proteomic changes of aryl hydrocarbon receptor ( AhR ) -silenced porcine granulosa dioxin ( TCDD ). 2019;1–17.
  36. Neavin DR, Liu D, Ray B, Weinshilboum RM. The role of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) in immune and inflammatory diseases. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12).
  37. Sun M, Ma N, He T, Johnston LJ, Ma X. Tryptophan (Trp) modulates gut homeostasis via aryl hydrocarbon receptor (AhR). *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;8398:1–9.
  38. Holme JA, Brinchmann BC, Refsnes M, Låg M, Øvrevik J. Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons as mediators of cardiovascular effects from combustion particles. *Environ Heal [Internet]*. 2019;18(1):74. Available from: <https://ehjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12940-019-0514-2>

39. Murray IA, Patterson AD, Perdew GH. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: Friend and foe. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(12):801–14.
40. Paris A, Tardif N, Galibert MD, Corre S. AhR and cancer: From gene profiling to targeted therapy. *Int J Mol Sci*. 2021;22(2):1–22.
41. Savoure JF, Antenos M, Quesne M, Xu J, Milgrom E, Casper RF. 7Ketocholesterol Is an Endogenous Modulator for the Arylhydrocarbon Receptor. *J Biol Chem*. 2001;276(5):3054–9.
42. Mohammadi-Bardbori A, Omid M, Arabnezhad MR. Impact of CH223191-Induced Mitochondrial Dysfunction on Its Aryl Hydrocarbon Receptor Agonistic and Antagonistic Activities. *Chem Res Toxicol*. 2019;32(4):691–7.
43. Gabriely G, Quintana FJ. Role of AHR in the control of GBM-associated myeloid cells. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2019;(May):0–1. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.05.014>
44. Reyes-Reyes EM, Ramos IN, Tavera-Garcia MA, Ramos KS. The aryl hydrocarbon receptor agonist benzo(a)pyrene reactivates LINE-1 in HepG2 cells through canonical TGF- $\beta$ 1 signaling: Implications in hepatocellular carcinogenesis. *Am J Cancer Res*. 2016;6(5):1066–77.
45. Duan Z, Li Y, Li L. Promoting epithelial-to-mesenchymal transition by dkynurenine via activating aryl hydrocarbon receptor. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 2018;448(1–2):165–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-018-3323-y>
46. Opitz CA, Litzenburger UM, Opitz U, Sahm F, Ochs K, Lutz C, et al. The indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibitor 1-methyl-d-tryptophan upregulates IDO1 in human cancer cells. *PLoS One*. 2011;6(5).
47. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, et al. NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets - Update. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(D1):991–5.
48. Lee JS, Leem SH, Lee SY, Kim SC, Park ES, Kim SB, et al. Expression signature of E2F1 and its associated genes predict superficial to invasive progression of bladder tumors. *J Clin Oncol*. 2010;28(16):2660–7.
49. Kim WJ, Kim EJ, Kim SK, Kim YJ, Ha YS, Jeong PP, et al. Predictive value of progression-related gene classifier in primary non-muscle invasive bladder cancer. *Mol Cancer*. 2010;9:1–9.
50. Kamat AM. Bladder Cancer Guidelines: Let Not the Cure Be Worse than the Disease. *Eur Urol* [Internet]. 2021;79(1):105–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2020.04.054>
51. Van Der Horst G, Bos L, Van Der Pluijm G. Epithelial plasticity, cancer stem cells, and the tumor-supportive stroma in bladder carcinoma. *Mol Cancer Res*. 2012;10(8):995–1009.

52. Matheus LHG, Dalmazzo SV, Brito RBO, Pereira LA, De Almeida RJ, Camacho CP, et al. 1-Methyl-D-tryptophan activates aryl hydrocarbon receptor, a pathway associated with bladder cancer progression. *BMC Cancer*. 2020;20(1):1–7.
53. Li L, Wang T, Li S, Chen Z, Wu J, Cao W, et al. TDO2 Promotes the EMT of Hepatocellular Carcinoma Through Kyn-AhR Pathway. *Front Oncol*. 2021;10(January):1–12.
54. Yang J, Antin P, Berx G, Blanpain C, Brabletz T, Bronner M, et al.

Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(6):341–52.