

RAFAEL MAGDANELO LEANDRO

**Expressão da enzima Indoleamina-2,3-dioxigenase em neoplasias
mamárias de cães**



SÃO PAULO
2014

RAFAEL MAGDANELO LEANDRO

Expressão da enzima Indoleamina-2,3-dioxigenase em neoplasias mamárias de cães

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior

SÃO PAULO

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2997
FMVZ

Leandro, Rafael Magdanelo
Expressão da enzima Indoleamina-2,3-dioxigenase / Rafael Magdaleno Leandro. -- 2014.
90 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior.

1. Cães. 2. Neoplasia mamária. 3. IDO. 4. Citometria de fluxo. I. Título.

ERRATA

LEANDRO, R. M. Expressão da enzima Indoleamina-2,3-dioxigenase em neoplasias mamárias de cães [Expression of the enzyme indoleamine-2,3-dioxygenase in mammary tumors of dogs]. 2014. 90 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2014.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	título	Expressão da enzima Indoleamina-2,3-dioxigenase	Expressão da enzima Indoleamina-2,3-dioxigenase em neoplasias mamárias de cães



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Expressão da enzima Indoleamina-2,3-dioxigenase em neoplasias mamárias de cães”, protocolado sob o nº 2530/2012, utilizando 20 (vinte) cães, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/2/2012.

We certify that the Research “Expression of the enzyme indoleamine-2,3-dioxygenase in mammary tumors in dogs”, protocol number 2530/2012, utilizing 20 (twenty) dogs, under the responsibility Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 2/15/2012.

São Paulo, 16 de fevereiro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LEANDRO, Rafael Magdanelo

Título: Expressão da enzima Indoleamina-2,3-dioxigenase em neoplasias mamárias de cães

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: __/__/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr.: _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr.: _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr.: _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr.: _____

Instituição _____ Julgamento _____

DEDICATÓRIA

À minha irmã, ao Bem e principalmente à minha mãe, a qual não mediu esforços durante toda sua vida, para me proporcionar todo o conforto e oportunidades. Sua dedicação foi essencial para minha formação, e seu amor peça fundamental para meu desenvolvimento.

À minha querida Vó, apesar de não estar mais vivendo neste mundo para acompanhar esta conquista, sinto sua presença todos os dias ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu amigo e orientador, Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior por ter me aceitado como seu aluno e por dividir inúmeras horas de conversas, risadas, conselhos e muitos ensinamentos nestes últimos três anos, dando as ferramentas e diretrizes necessárias para eu concluir este trabalho e realizar meu sonho.

À minha companheira, amiga e amor da minha vida Fernanda, por me apoiar incondicionalmente e por ficar ao meu lado em todos os momentos.

Agradeço a extrema paciência, boa vontade, auxílio e companheirismo dos colegas de pós-graduação Letícia Salvadori; Pedro Bianchi, Fernanda Cardoso e Graziella Menck por terem dividido ao meu lado grandes momentos no laboratório nestes últimos anos.

Serei eternamente grato a Maria Eugênia Carretero e especialmente a minha amiga Sonia Will, pela sua paciência e disponibilidade em me ajudar, sem sua ajuda eu não teria concluído este trabalho.

Aos professores Dr. Paulo Maiorka, Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, Dra. Lílian Rose Marques de Sá e Dra. Cristina Massoco pelo auxílio no desenvolvimento do projeto e nas análises dos resultados.

Aos meus amigos da Universidade de Santo Amaro especialmente ao M.V Maurício Zago Flocke e aos professores Dra Kátia Stracieri D'Oliveira, Dra Andréa Barbosa, Dra Claudia Brito e o Dr. Rafael Agopian pela amizade, apoio e incentivo.

À Fapesp pelo auxílio à pesquisa e a todos funcionários do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ-USP que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

“Na vida não vale tanto o que temos,
Nem tanto importa o que somos
Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e,
Acima de tudo, importa o que fazemos de nós
“Não podemos ter um novo começo, mas podemos ter um novo final”

Chico Xavier

RESUMO

LEANDRO, R. M. **Expressão da enzima Indoleamina-2,3-dioxigenase em neoplasias mamárias de cães** [Expression of the enzyme indoleamine-2,3-dioxygenase in mammary tumors of dogs]. 2014. 90 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2014.

A indoleamina - 2,3 – dioxigenase (IDO) é uma enzima expressa por diversas células do organismo e, dentre suas muitas funções, atua principalmente na regulação do sistema imune. Esta se baseia no catabolismo do triptofano, cuja depleção induz uma interrupção do ciclo celular em linfócitos T, tornando-os mais sensíveis a apoptose aliado à ação de metabólitos provenientes desta reação os derivados da quinurenina que potencializariam a atividade da IDO. A presença e ativação de IDO em alguns tipos tumorais representam um dos mecanismos pelo qual as células tumorais podem se evadir do sistema imune, facilitando a indução, crescimento e progressão tumoral. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil epidemiológico e anatomopatológico de 21 animais portadores de neoplasias mamárias, além de verificar, pelas técnicas de imuno-histoquímica e citometria de fluxo, o número de células neoplásicas e inflamatórias que expressam IDO em cultivo celular na presença de fatores como seu substrato L- triptofano e seu inibidor competitivo 1-metil-DL-triptofano (1MT). As neoplasias malignas corresponderam a 86% dos casos e o principal diagnóstico histopatológico encontrado foi o carcinoma simples. No que concerne à idade, todos os animais apresentaram idade média igual a $10,3 \pm 3,3$ anos. Na análise imuno-histoquímica os resultados mostraram que todas as amostras apresentaram imunomarcagem citoplasmática para IDO confinado principalmente nas células localizadas nos ductos mamários. Os resultados in vitro indicam que, após 24 horas, o grupo suplementado com L - triptofano apresentou aumento significativo da expressão de IDO nas células de carcinoma simples ($49,5 \pm 2,5$) ($p \leq 0,01$), enquanto o grupo tratado 1 metil –DL- triptofano exibiu uma diminuição significativa na expressão de IDO ($33,8 \pm 4,0$) ($p \leq 0,01$). Os macrófagos e células dendríticas na área tumoral também expressaram IDO e foram susceptíveis ao efeito de 1MT. Atualmente, na medicina veterinária procura de novas estratégias e compostos para a modulação da resposta antitumoral em pequenos animais e o 1 - metil - DL - triptofano representaria um candidato potencial para uma abordagem complementar no tratamento de neoplasias mamárias.

Palavras-Chave: Cães. Neoplasia. mamária. IDO. Citometria de fluxo.

ABSTRACT

LEANDRO, R. M. **Expression of the enzyme indoleamine-2,3-dioxygenase in mammary tumors of dogs** [Expressão da enzima Indoleamina-2,3-dioxigenase em neoplasias mamárias de cães]. 2014. 90 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2014.

The indoleamine - 2, 3 - dioxygenase (IDO) is an enzyme expressed on many cells and among its functions acts mainly in regulation of the immune system. It relies on the tryptophan catabolism, whose depletion induces cell cycle arrest of T lymphocytes turning these cells more sensitive to apoptosis, in addition to some down-stream tryptophan-derived metabolites that would increase IDO activity. The presence and activation of IDO in some tumor types represents a mechanism by which tumor cells can evade the immune system, thus facilitating the induction and progression of tumor growth. Our aim was to evaluate 21 animals with mammary tumors and to verify, by immunohistochemistry and flow cytometry, whether these cells express IDO, and to quantify its in vitro expression on neoplastic cells under influence of IDO substrate tryptophan and IDO competitive inhibitor 1-methyl-DL-tryptophan. Malignant neoplasms accounted for 86% of the cases and the most common diagnosis was carcinoma simple. All animals were adult females, with mean age of 10.3 ± 3 years. Immunohistochemistry results showed that all samples presented cytoplasmic immunostaining for IDO confined mainly in cells located in the mammary ducts. In vitro results indicate that, after 24 hours, the group supplemented with L - tryptophan showed significant increased expression of IDO in carcinoma cells (49.5 ± 2.5) ($p \leq 0.05$), while the 1MT treated group displayed a significant decreased on IDO expression (33.8 ± 4.0) ($p \leq 0.05$). Macrophages and dendritic cells at the tumour site also expressed IDO and were susceptible to the effect of 1MT. Currently, veterinary medicine seeks new strategies and compounds for modulating the antitumor response in small animals and 1-methyl -DL-tryptophan would represent a potential candidate as a complementary approach for the treatment of mammary neoplasms.

Keywords: Dogs. Mammary neoplasia. IDO. Flow cytometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Degradação do aminoácido triptofano a partir da ação da IDO	28
Figura 2 -	Mecanismos tolerogênicos da IDO. A. Via das quinureninas. B. Ativação linfócitos T reguladores (Treg) diminuição da produção de IL-2 e aumento da produção IL-10 e TGF- β , bloqueio do ciclo celular de linfócitos T e células apresentadoras de antígenos e Natural Killer (NK). C Depleção Triptofano e aumento dos metabólitos das via da quinurenina induz bloqueio no ciclo celular e apoptose. D. Indução de IDO frente a exposição de mediadores inflamatórios interferon- γ (IFN- γ), IL1, fator de necrose tumoral (TNF- α). E. Inibição resposta imune celular.....	30
Figura 3 -	Distribuição dos diagnósticos morfológicos dos animais portadores de neoplasias mamárias, São Paulo - Janeiro. 2012 - Agosto.2013	42
Figura 4 -	Western Blot de um carcinoma túbulo papilífero grau I. Fotografia de membrana de PVDF demonstrando a Presença de proteínas com massa molecular entre 17,26 KD e e 32,01KD.....	46
Figura 5 -	Fotomicrografia Carcinoma túbulo papilífero grau II. HE, Bar. 200 μ m	48
Figura 6 -	Fotomicrografia Carcinoma túbulo papilífero grau II. Imunomarcção para IDO + localizado nos túbulos mamários. Técnica Estreptavidina-biotina - peroxidase contra corada por Hematoxilina de Harris. IHQ, Bar.200 μ m.....	48
Figura 7 -	Fotomicrografia Carcinoma túbulo papilífero grau I. Imunomarcção para IDO + localizado nos túbulos mamários. Técnica Estreptavidina-biotina peroxidase contra corada por Hematoxilina de Harris. IHQ, Bar.200 μ m.....	48
Figura 8 -	Fotomicrografia Carcinoma túbulo papilífero grau I. Controle negativo para IDO. Estreptavidina-biotina - peroxidase contracorada por Hematoxilina de Harris. IHQ, Bar. 200 μ m.....	48
Figura 9 -	Fotomicrografia carcinoma sólido I. Observar células atípicas, pleomorfismo celular e anisocariose HE, Bar.50 μ m.....	48
Figura 10 -	Fotomicrografia carcinoma sólido. Observar nas células presença de múltiplos grânulos intracitoplasmáticos. Imunomarcção para IDO +. Técnica Estreptavidina-biotina peroxidase contra corada por Hematoxilina de Harris. Bar. 120 μ m	48

Figura 11 -	Fotomicrografia Carcinoma túbulo papilífero grau II. Células tubulares apresentando intensidade de imunomarcção IDO + fraca (Escore 1). Método Estreptavidina-biotina-peroxidase contra corada por Hematoxilina de Harris. IHQ, Bar.....	49
Figura 12 -	Fotomicrografia Carcinoma mioepitelioma maligno grau I. Células tubulares apresentando intensidade de imunomarcção IDO + forte (Escore 3). Método Estreptavidina-biotina-peroxidase contra corada por Hematoxilina de Harris. IHQ, Bar. 50 µm.....	49
Figura 13	Fotomicrografia mostrando células mononucleares apresentando Imunomarcção para IDO + localizadas no estroma tumoral. Técnica Estreptavidina-biotina peroxidase contra corada por Hematoxilina de Harris. Bar. 50 µm.....	49
Figura 14-	Comparação da expressão de IDO entre os diferentes grupos de tratamento após 24 horas. O grupo 2 (L - Triptofano) apresentou níveis superiores de expressão de IDO quando comparado ao grupo 1 (Controle) (P-value = 0.001) e ao grupo 3 (1 metil- DL- triptofano) (P-value = 0.001). Não houve diferenças estatisticamente significativas (P-value = 1,000) entre os grupos 1 e 3.....	68
Figura 15 -	Comparação da expressão de IDO nas células dendríticas (CD11C) e macrófagos (CD11B) frente aos diferentes grupos de tratamento após 24 horas.....	69
Figura 16 –	Density plot e histogramas controles. A. O density plot em azul representa as populações celulares encontradas. B Histograma. Fluorescência - anticorpo secundário (PE). C. Histograma violeta viabilidade celular, porcentagem células vivas. D. Histograma Iodeto de propídeo – viabilidade celular, porcentagem de células mortas.....	70
Figura 17–	A. Histograma Grupo 1 (controle) - porcentagem de células que expressão IDO sem suplementação. D. Histograma Grupo 2- Porcentagem de células que expressam IDO quando suplementadas com L - triptofano. E. Histograma Grupo 3 Porcentagem de células que expressam IDO quando suplementadas com L - triptofano e 1-metil-DL - triptofano.....	71
Figura 18–	Density plot com quadrantes - Q1. Marcação positiva para anticorpo CD11C; Q2. Dupla marcação positiva para anticorpo CD11C e IDO; Q3 Marcação positiva para anticorpo IDO, Q4 Dupla Marcação negativa. A . Density plot Grupo 1 (controle) - porcentagem de células que expressão IDO sem suplementação. B. Density plot Grupo 2- Porcentagem de células que expressam IDO quando suplementadas com L- triptofano. C. Density plot Grupo 3 - Porcentagem de células que expressam IDO quando suplementadas com L -triptofano e 1 metil- DL- triptofano.....	72

Figura 19 – **Density plot** com quadrantes - **Q1**. Marcação positiva para anticorpo CD11B; **Q2**. Dupla marcação positiva para anticorpo CD11B e IDO; **Q3** Marcação positiva para anticorpo IDO, **Q4** Dupla Marcação negativa. **A. Density plot Grupo 1 (controle)** porcentagem de células que expressam IDO sem suplementação. **B. Density plot Grupo 2-** Porcentagem de células que expressam IDO quando suplementadas com L - triptofano. **C. Density plot Grupo 3 -** Porcentagem de células que expressam IDO quando suplementadas com L- triptofano e 1 metil- DI-triptofano73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais mediadores responsáveis pela indução de IDO.....	29
Tabela 2 -	Escore de Intensidade da imunomarcção das neoplasias mamárias submetidas reação imuno-histoquímica pelo com anticorpo anti-IDO.....	40
Tabela 3 -	Distribuição das principais raças dos com neoplasia mamária. São Paulo - Janeiro.2012 - Agosto. 2013.....	43
Tabela 4 -	Distribuição dos resultados laboratoriais dos animais portadores de neoplasias mamárias, média, desvio padrão (DP), valores mínimo e máximo– São Paulo – Janeiro. 2012 - Agosto. 2013.....	44
Tabela 5 -	Distribuição anatômica das neofomações na cadeia mamaria, São Paulo - Janeiro. 2012 – Agosto.2013.....	45
Tabela 6 -	Distribuição do tamanho das neofomações (cm) nas mamas, São Paulo - Janeiro. 2012 - Agosto. 2013.....	46
Tabela 7 -	Distribuição do escore de imunomarcção das células epiteliais, atípicas,macrófagos e linfócitos para o anticorpo anti-IDO.....	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Distribuição dos cães com neoplasia mamária segundo número do caso, sexo, raça, idade, e diagnóstico morfológico. São Paulo Janeiro. 2012 Agosto.2013.....	37
Quadro 2 -	Lista de anticorpos primários, secundários, diluição, código e dados do fabricante.....	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERA	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	NEOPLASIA MAMÁRIA	20
2.2	IMUNOVIGILÂNCIA E IMUNOEDIÇÃO DAS NEOPLASIAS.....	23
2.3	INDOLEAMINA 2,3 DIOXIGENASE.....	26
3	EXPRESSÃO DA ENZIMA INDOLEAMINA-2,3-DIOXIGENASE EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CÃES.....	33
3.1	INTRODUÇÃO	35
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.2.1.	Casuística.....	36
3.2.2.	Avaliação anatomopatológica	38
3.2.3.	Estudo imuno-histoquímico	38
3.2.4.	Extração de proteínas e quantificação.....	40
3.2.5.	Western blot	41
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
3.4	RESULTADOS	42
3.4.1	Distribuição dos animais quanto ao diagnóstico morfológico das neoplasias mamárias	42
3.4.2	Caracterização dos cães segundo o sexo, idade e raça	43
3.4.3	Caracterização laboratorial.....	44
3.4.4	Localização anatômica	45
3.4.5	Tamanho	45
3.4.6	Avaliação imunohistoquímica.....	46
3.5	DISCUSSÃO	51
3.6	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS.....	57

4	EXPRESSÃO E SUPRESSÃO IN VITRO DA INDOLEAMINA-2, 3-DIOXIGENASE DE PELO 1-METIL-DL-TRIPTOFANO EM CÉLULAS DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CÃES.....	60
4.1	INTRODUÇÃO	62
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	63
4.2.1	Casuística.....	63
4.2.2	Cultura célula.....	63
4.2.3	Determinação da Concentração e viabilidade celular e confecção dos grupos de análise.....	64
4.2.4	Citometria de fluxo	65
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
4.4	RESULTADOS	68
4.5	DISCUSSÃO	74
4.6	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	78
	ANEXOS	88

1. INTRODUÇÃO GERAL

No dia-a-dia da clínica veterinária de pequenos animais, é amplamente reconhecido que o câncer de mama é a principal neoplasia que acomete fêmeas da espécie canina, apresentando alta morbidade e mortalidade, estando entre os motivos mais comuns que levam os proprietários de animais de companhia a procurarem um médico veterinário. De fato, apenas as neoplasias cutâneas são mais comumente avaliadas na rotina do consultório veterinário.

Em virtude da elevada incidência das neoplasias mamárias, seu estudo vem crescendo em relação a outras afecções neoplásicas em virtude da alta frequência com que novos casos surgem na clínica de pequenos animais. Adicionalmente cada vez mais os proprietários de animais de companhia exigem tratamentos semelhantes aos empregados em seres humanos.

As neoplasias mamárias representam um grande desafio ao patologista uma vez que é difícil estabelecer um diagnóstico histopatológico específico, pois distintos tipos morfológicos podem ocorrer em uma ou mais glândulas mamárias de forma simultânea. Dentre as neoplasias malignas, o carcinoma destaca-se como o mais comum. Em razão da alta complexidade para se estabelecer o diagnóstico histopatológico preciso, o atraso no diagnóstico pode limitar as opções terapêuticas e, em última análise, o sucesso do tratamento em muitos casos, pois recidivas e metástases à distância são comuns na maioria dos casos.

No Brasil, existe uma carência de registros e dados epidemiológicos sobre a verdadeira incidência e prevalência das neoplasias mamárias em cães o que torna premente o rastreamento e a caracterização dessas no nosso contexto. Estudos multidisciplinares envolvendo informações epidemiológicas, clínico-laboratoriais, anatomopatológicos, imuno-histoquímicas e biomoleculares possibilitam o reconhecimento dos principais fatores de risco e caracterização do comportamento biológico tumoral.

A oncologia é uma das áreas emergentes do conhecimento na Medicina Veterinária e vem recebendo atenção especial por diversos autores, atualmente as principais linhas de pesquisas buscam compreender os mecanismos de transformação e progressão tumoral bem como os mecanismos de sinalização intercelular e angiogênese.

O câncer é um processo complexo e multifatorial cujo denominador comum na etiologia de todas as neoplasias são mutações no genoma celular. As causas destas mutações são variadas, destaca-se dentre elas, erros espontâneos na replicação de DNA, além da influência

de agentes carcinogênicos como metais, compostos químicos, energia radioativa, vírus oncogênicos e inflamações crônicas.

Aliado a isto na última década o conceito de imunovigilância e a interação entre imunidade e progressão tumoral vem recebendo atenção especial por diversos autores. A indoleamina- 2,3 – dioxigenase (IDO) é uma enzima expressa por diversas células do organismo e dentre suas muitas funções atua principalmente na regulação do sistema imune. (MUNN et al, 1998). Esta enzima atua inibindo a proliferação e induzindo apoptose de linfócitos T, pelo catabolismo do aminoácido triptofano e pela produção de metabolitos que são gerados a partir desta reação, os derivados da quinurenina.

Os efeitos imunomoduladores decorrentes da expressão da indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) pelas neoplasias pode ser uma importante via de evasão e tolerância tumoral ao sistema imune, facilitando a indução, crescimento e progressão tumoral, uma vez que o sistema imunológico apresenta um importante papel na resposta imune inata contra os tumores através da ativação de células dendríticas e pela apresentação de antígenos tumorais às células T em órgãos linfáticos secundários como os linfonodos (MUNN et al. 2004; OCHSENBEIN, 2005).

A contínua busca para evidenciar a relação entre imunidade e progressão tumoral poderá trazer importantes implicações, tais como: a relação entre inflamação e prognóstico; as possíveis conexões entre imunossupressão e o câncer; além da compreensão do processo de regressão espontânea de neoplasias (TORREZINI, T; ATHANAZIO, D, 2006). O entendimento destes conceitos terá aplicação para compreender o que determina o surgimento e a progressão de neoplasias, bem como indicar tratamentos diferenciados para o câncer avançado. Um fármaco que bloqueie a ação da IDO como o composto 1 metil – DL - triptofano pode ser útil para na reversão da imunossupressão induzida pelos tumores além de proporcionar a criação de novas estratégias de tratamento seja como tratamento padrão ou complementar a quimioterapia em pacientes portadores de neoplasias especialmente em estágios avançados cujos tratamentos atuais são ainda pouco eficientes.

Devido à sua relevância neste contexto, aliado à elevada incidência de neoplasia mamária e à extrema carência de informação na área de imunoterapia veterinária, este estudo visa caracterizar a expressão da IDO nas neoplasias mamárias malignas de cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEOPLASIA MAMÁRIA

As neoplasias mamárias são, entre todos os tipos de tumores, os mais comumente diagnosticados na fêmea canina (MARIA et al., 1998; DE NARDI, 2002), especialmente nas cadelas não submetidas à esterilização cirúrgica prévia ao diagnóstico e os tipos malignos variam, em ocorrência, de 26 a 73% (PÉREZ-ALENZA et al., 2000; RUTTEMAN et al., 2001). Dos tipos malignos o carcinoma destaca-se como mais comum (MISDORP et al., 1999).

Segundo Moulton et al. (1990) as neoplasias mamárias, são raras em cadelas com menos de dois anos de idade, porém a incidência aumenta abruptamente aos seis, continuando a aumentar até os 10 anos, quando a ocorrência começa a diminuir, sendo raro em cadelas com idade superior a 12 anos. A incidência das neoplasias mamárias em machos é muito baixa cerca de 1% quando comparado às cadelas, e tal fato se deve pela pequena quantidade de tecido mamário encontrado na glândula destes animais (BRODEY et al., 1983). Alterações da glândula mamária em cães machos estão geralmente associadas com anormalidades hormonais, como tumores funcionais de células de Sertoli (MISDORP 2002), que induzem principalmente ginecomastia (MISDORP et al., 1999; MACLACHALAN; KENNEDY, 2002, CASSALI, 2003).

No tocante à raça, segundo Brodey, Goldschimite e Rozel (1983) as raças puras Cocker Spaniels, Pointer, Poodle, Labrador, Pastor alemão, Fox Terrier e Retriever foram relacionadas como mais frequentemente acometidas, embora Ferguson (1985) coloque que nenhuma predileção racial tenha sido estabelecida. Essa falta de unanimidade possivelmente deva ocorrer pelas diferenças nas amostras populacionais caninas usadas nos estudos (FERGUNSON, 1985)

O desenvolvimento das neoplasias mamárias é menos frequente nas glândulas torácicas, sendo que a proporção aumenta gradativamente até as glândulas inguinais (SORRIBAS, 1995).

Aproximadamente 60% das cadelas têm neoplasias em mais de uma mama se concentrando principalmente nas mamas abdominais e inguinais, possivelmente por serem as que contem maior quantidade de parênquima, com maior atividade proliferativa em resposta ao estrógeno, mas não parece haver diferença no prognóstico em relação à glândula afetada (BENJAMINEN et al., 1999). As neoplasias mamárias em cães representam um grande desafio ao clínico e patologista uma vez que é difícil estabelecer um diagnóstico histopatológico específico, pois distintos tipos morfológicos podem ocorrer em uma ou mais glândulas mamárias de forma simultânea (PELETEIRO, 1994).

A complexidade das neoplasias mamárias decorre principalmente do próprio tecido mamário, cuja estrutura histológica é heterogênea. As neoplasias originam-se a partir de células epiteliais ductuolares e ou alveolares, células mioepiteliais adjacentes ao epitélio e ou células do tecido conjuntivo intersticial (ZUCCARI et al.; 2001).

Vários são os estudos realizados com neoplasias mamárias que mostram diferenças em relação à malignidade ou não desses tumores. Fidler, Adt e Brodey (1967) obtiveram como resultado da análise de 161 tumores mamários, 52,7% de malignos, 41,8% de benignos e 5,5% de tumores potencialmente malignos. Priester e Montel (1971) observaram em sua casuística que 46% dos tumores eram malignos. Moulton (1990) coloca que 50 a 60% dos tumores de glândulas mamárias são benignos sendo a maioria desses fibroadenomas. Os outros 40 a 50% são malignos e cerca da metade desses tumores podem metastatizar.

Recentemente, uma avaliação retrospectiva de 1936 a 1999, realizada por Martins (2000), com 1371 casos de alterações nas glândulas mamárias de cadelas, analisados histologicamente, demonstrou que 91% delas eram malignas representadas (98% por carcinomas e 2% por sarcomas), 8,5% por neoplasias benignas e 1% por hiperplasias.

Relativamente ao tipo histológico dos tumores, o carcinoma simples é o mais prevalente, seguido pelos tumores mistos malignos (FILHO et al 2010). A alta prevalência de carcinoma simples e tumores mistos malignos também foi observada em outros estudos (DALECK et al., 1998, ZUCCARI et al., 2001).

Mulligan (1975) encontrou em seu estudo 66,4% de carcinomas de ducto, 29,6% de carcinomas lobulares, 2,3% de tumores malignos mistos e 1,5% de carcinomas ducto lobulares. Bostock (1977) em um estudo realizado com 1625 tumores mamários em cadelas apresentou como resultado a seguinte distribuição: 51% deles eram benignos sendo 45,5% fibroadenomas, 5% adenomas simples e 0,5% tumores mesenquimais benignos.

Dos 49% de tumores malignos, 16,9% eram carcinomas sólidos, 15,4% adenocarcinomas tubulares, 8,6 % adenocarcinomas papilares, 45 carcinomas anaplásicos, 3,1 sarcomas e 0,6% carcinossarcomas,

Macroscopicamente as neoplasias benignas são pequenas, podendo ser circunscritas, não aderidas aos tecidos adjacentes e costumam apresentar crescimento lento. No entanto, as neoplasias malignas exibem crescimento invasivo, podendo ser ulceradas e na maioria das vezes apresentam evolução rápida. Metástases são frequentes e podem ocorrer tanto pela via hematogena como pela drenagem linfática sendo frequentemente observado nos linfonodos regionais (axilares e inguinais) e em sítios distantes como pulmões, coração, baço, adrenais, fígado, ossos, rins, pele e encéfalo (MISDORP, 1999)

A hipótese da etiologia hormonal no desenvolvimento da neoplasia mamária em cadelas tem tido grande aceitação junto aos investigadores clínicos, pois determinados hormônios podem influenciar o desenvolvimento do câncer. Hormônios como estrógeno, progesterona e o hormônio do crescimento podem influenciar diretamente a carcinogênese. A incidência de neoplasias mamárias aumenta com o uso de progestágenos injetáveis. A progesterona exógena estimula a síntese do hormônio do crescimento, proporcionando uma proliferação lóbulo-alveolar e conseqüentemente hiperplasia de elementos mioepiteliais e secretórios, induzindo o crescimento de neoplasias benignas em animais jovens.

O rápido desenvolvimento das glândulas mamárias durante a puberdade, período em que a ação estrogênica é acentuada, pode contribuir para a formação de clones de células alteradas, o que predispõe à formação de nódulos neoplásicos. Estas lesões sofrem ação direta do estrógeno, o que induz à proliferação do epitélio ductal e, desta forma, propicia condições necessárias para que mutações genéticas ocorram. Como já descrito, o estrógeno também pode estar envolvido na transformação maligna pela regulação transcricional de muitos proto-oncogenes (PELETEIRO, 1994).

Algumas neoplasias desenvolvem-se de forma acelerada durante e após as fases de estro e diestro. Nas neoplasias císticas, a progesterona estimula a multiplicação e a secreção celular por parte das células neoplásicas. No entanto, desordens relacionadas ao ciclo estral como, ovário policístico, persistência de corpo lúteo, hiperplasia endometrial e pseudogestação não aumentam o risco de desenvolvimento das neoplasias em cadelas (PELETEIRO, 1994).

Outra ocorrência que apoia a hormônio dependência é a identificação de receptores de estrógenos e progesterona nestas lesões em 40 a 60% dos casos (RUTTEMAN et al., 2001). Alguns receptores hormonais, como os de estrógenos, andrógenos, progestágenos, prolactina

e para o fator de crescimento epidérmico já foram encontrados em neoplasias mamárias de cadelas, podendo haver vários receptores em um mesmo tumor (RUTTEMAN et al., 2001).

Existem diferenças significativas quanto ao índice de risco de neoplasias mamárias entre cadelas castradas e não castradas. O risco de desenvolvimento de tumores mamários é de 0,5% em cadelas castradas antes do primeiro cio; 8% quando a esterilização for realizada após o primeiro cio e de 26% quando esse procedimento é feito após o segundo cio (SCHNEIDER et al., 1969). Os animais submetidos à castração após os dois anos e meio de idade não necessariamente podem ser beneficiados pelos efeitos profiláticos de esterilização, isto porque neste momento as glândulas mamárias já estão plenamente desenvolvidas e diferenciadas (MOULTON, 1990). É importante salientar que a castração concomitante com a mastectomia não tem efeito sobre o prognóstico em animais com neoplasia mamária (YAMAGAMI et al., 1996).

Fatores nutricionais podem influenciar o desenvolvimento da neoplasia mamária. Estudos epidemiológicos com seres humanos e camundongos demonstraram que dietas gordurosas e obesidade aumentam o risco de ocorrência das neoplasias mamárias.

Os fatores prognósticos mais importantes relacionados à neoplasia mamária canina são o tamanho do tumor, envolvimento dos linfonodos, presença de metástases à distância, tipo histológico, grau de malignidade, grau de diferenciação nuclear, grau de invasão, aneuploidia do DNA (CHUN; GARRET, 2005).

2.2. IMUNOVIGILÂNCIA E IMUNOEDIÇÃO DAS NEOPLASIAS

Os primeiros relatos que o sistema imune apresenta um importante papel no controle das neoplasias foi concebido pelo cientista Paul Erlich no ano de 1908 que propôs que o reconhecimento imune contra células cancerígenas é um mecanismo capaz de eliminar as neoplasias, porém o estágio de desenvolvimento experimental da imunologia naquele período não permitiu a comprovação científica da hipótese.

Subsequentemente, na década de 1950, Macfarlane Burnet e Lewis Thomas formalizaram a hipótese da imunovigilância, sugerindo que a função normal do sistema imune é vigiar e destruir eventuais células com alterações malignas nos organismos multicelulares (BURNET, 1970; DUNN et al., 2002). Esta ideia teve apoio através da continua observação

de infiltrado linfocítico em torno das neoplasias e nos linfonodos sentinelas adjacentes á área acometida.

Um requisito para a aceitação da hipótese seria a observação experimental de que animais e seres humanos imunodeficientes apresentam incidência maior de neoplasias. Inicialmente, estudos em camundongos atímicos não mostraram um aumento na incidência de tumores espontâneos ou induzidos o que relegou o conceito de imunovigilância ao abandono pela comunidade científica por pelo menos duas décadas (STRUMAN, 1979).

A partir da década de 1990, no entanto, novos modelos experimentais, baseados no uso de animais transgênicos e anticorpos monoclonais, permitiram uma abordagem mais acurada da interação entre o sistema imune e o câncer. A atuação da imunidade no controle do surgimento de neoplasias incipientes foi amplamente demonstrada no modelo murino, revigorando o conceito de imunovigilância e, inclusive, demonstrando o papel do sistema imune no controle do crescimento de neoplasias em estágios mais avançados (ENGEL et al., 1996; SVANE et al.; 1996).

Estudos prospectivos avaliando 415 pacientes humanos com câncer colorretal apontaram que os linfócitos são células importantes para resposta adaptativa no controle da progressão destes tumores. Pacientes que apresentaram maior quantificação de células T de memória intratumorais (CD45RO+) apresentaram melhor prognóstico relacionado à maior sobrevida. Os tumores com maior infiltrado linfocítico apresentavam menor sinal histopatológico de potencial metastático (presença de êmbolos tumorais, invasão linfática e invasão perineural (PAGES et al., 2005).

Estes achados indicam que, o sistema imune exerce uma pressão seletiva sobre os tumores, induzindo sua eliminação ou seleção de subclones menos imunogênicos, moldando seu fenótipo durante a progressão tumoral (DUNN et al., 2004).

Atualmente o conceito de vigilância imune se expandiu para abranger, não somente o papel protetor do sistema imune no desenvolvimento do câncer, mas também os métodos que as neoplasias conseguem burlar o sistema imune e se desenvolverem. Essa nova abordagem incluiu um novo conceito, o de imunoeedição. O sistema imune interage com a célula tumoral não só na sua formação, mas também no seu desenvolvimento. Este processo envolve a seleção de mecanismos de evasão pelas células tumorais, permitindo o seu crescimento até o estágio clinicamente detectável. Esse processo ocorre em três fases distintas: uma de eliminação; uma de equilíbrio e uma de escape das células tumorais e consequente progressão do tumor (DUNN et al., 2004).

A primeira fase (de eliminação) corresponde à imunovigilância. É a capacidade do sistema imune de reconhecer um antígeno tumoral ou uma modificação no tecido envolvido e proporcionar o ataque às células neoplásicas. Este mecanismo depende da interação dos sistemas imune inato e adaptativo. Independente do mecanismo de reconhecimento inato, as vias efetoras são mediadas pela via do IFN- γ . Células dendríticas apresentadoras de antígenos tumorais drenam para um linfonodo e estimulam a proliferação de células T CD4+ e CD8+ tumor-específica. Por fim, as células da imunidade adquirida são atraídas para o local da neoplasia onde reconhecem e destroem as células tumorais que expressam os antígenos específicos (DUNN et al., 2004).

Em um segundo momento é denominado fase de equilíbrio, onde as células tumorais selecionadas que não foram destruídas geram variantes que carregam mutações possibilitando a resistência. Segue-se uma fase de equilíbrio com o sistema imune, na qual coexistem as células de baixa imunogenicidade que compõem o tumor e as células e moléculas responsáveis pelo controle do crescimento das mesmas.

Na terceira fase (de escape ou evasão), os tumores acumulam habilidades que impedem o ataque do sistema imune. Isto pode ocorrer através da liberação de citocinas inibitórias - TGF- β , IL-10 ou prostaglandina E2 - ou através de modificações estruturais como a perda de moléculas de MHC de classe I ou adquirindo insensibilidade ao IFN- γ (KIM et al.; 2007; RASKOVALOVA et al., 2007). Neste processo, as novas variantes de células tumorais, que não são reconhecidas pelo sistema imune, crescem de maneira descontrolada.

As neoplasias exercem um importante efeito imunomodulatório no microambiente tumoral. As células neoplásicas regulam seu crescimento, inibindo a resposta imune e favorecendo a angiogênese e invasão para tecidos adjacentes (ZOU, 2005). Isto significa que, mesmo dentro de um hospedeiro imunocompetente, a neoplasia pode gradualmente selecionar relações com células próximas que favoreçam um estado de hipoativação imune no microambiente tumoral. Entre alguns mecanismos conhecidos, as citocinas IL-6 produzidas por células tumorais ou macrófagos intratumorais, podem favorecer a diferenciação de macrófagos em detrimento da formação de células dendríticas, que funcionariam como principais apresentadoras de antígenos e instrutoras da imunidade adaptativa celular pela produção de citocinas como IL-12 e IFN- γ . Tais citocinas estão consistentemente inibidas no microambiente de vários tumores. De modo semelhante, tumores e/ou macrófagos relacionados podem secretar moléculas imunomoduladoras como IL-10 e TGF- β , que inibem a função e diferenciação de células dendríticas; assim como tumores frequentemente expressam ciclooxygenase 2, que tem como produto a prostaglandina E2, um inibidor da

diferenciação de células dendríticas. Outro mecanismo que minimiza o ataque do sistema imune é o fato de que os tumores expressam quimiocinas e recrutam células dendríticas plasmocitóides que no microambiente tumoral não expressam receptores de ativação (*Toll like 9*) e secretam grandes quantidades de IL-10.

Outra via de tolerância que será discutida mais detalhadamente na próxima seção é a expressão da enzima indoleamina 2,3-desoxigenase (IDO) que priva o triptofano do microambiente tumoral, um importante fator para proliferação de linfócitos (ZOU, 2005).

É importante ressaltar que estudos clínicos em seres humanos que apresentam perda da imunidade adquirida celular, cujos principais exemplos são pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e pacientes que foram submetidos a transplantes de órgãos sólidos submetidos à terapia imunossupressora crônica, têm claramente um risco maior de desenvolver neoplasias relacionadas a vírus, como carcinoma do colo do útero associado ao vírus do papiloma humano (HPV), linfomas associados ao vírus de Epstein-Barr (EBV) e sarcoma de Kaposi associado ao herpesvírus humano tipo 8 (HHV8) (STEWART et al., 1995; FRISCH et al., 2001). Na medicina veterinária um dos grandes exemplos é a leucemia viral felina que está intimamente relacionada ao desenvolvimento de linfoma e o sarcoma viral felino (GABOOR et al., 2001).

No entanto, o aumento desses tumores tanto em humanos como em animais reflete a ausência de resposta ao vírus e não necessariamente as neoplasias que eles causam. Portanto, a comprovação da imunovigilância em humanos e animais deve ser buscada nos relatos de incidência de tumores sólidos sem associação viral conhecida nas populações de indivíduos com baixa imunidade. Neste caso, os dados nem sempre são concordantes, e essas variações de resultados podem dificultar a elucidação do papel do sistema imune no desenvolvimento do câncer em humanos.

2.3 INDOLEAMINA 2,3- DIOXIGENASE (IDO)

A constatação de que a IDO tenha um efeito imunomodulador decorre de evidências recentes relacionadas á imunologia do aparelho reprodutor feminino. Porque a mãe, imunologicamente competente, não rejeita o feto durante a gravidez?

Medawar, em 1953, sugeriu que três fatores seriam os possíveis responsáveis pela não rejeição do feto: 1. Separação anatômica entre mãe e feto; 2. Imaturidade antigênica do feto; e 3. A tolerância imunológica da mãe durante a gravidez.

O terceiro fator foi eleito como verdadeiro, uma vez que o sistema imune materno é incapaz de rejeitar tecidos que expressam antígenos paternos apresentados pelo embrião durante a gravidez. Esta tolerância está relacionada à expressão de moléculas especiais no tecido placentário.

A evidência de que a IDO possa ser uma dessas moléculas vem com os estudos experimentais desenvolvidos por Munn e colaboradores em 1998 demonstrando que existe um aumento significativo da expressão de IDO em células trofoblásticas e que administração de 1metil-triptofano, um inibidor da IDO, causa rejeição do tecido embrionário em camundongos, mediada por linfócitos T (MUNN et al, 1998). Em estudos subsequentes o mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que células dendríticas e macrófagos “*in vitro*” expressando IDO inibiram a proliferação de linfócitos T através da depleção do triptofano.

A IDO é expressa em diferentes tecidos como trato gastrointestinal (esôfago, estômago, intestino delgado e grosso), sistema reprodutor masculino (epidídimo, testículo, próstata) e sistema urinário (bexiga e rim) (DAÍ; ZHU, 2010). Observa-se IDO também em células dendríticas, monócitos, macrófagos, eosinófilos, células epiteliais, fibroblastos, músculo liso, células endoteliais e em alguns tipos de neoplasias (DAÍ; ZHU, 2010).

O mecanismo pelo qual a IDO exerce um importante efeito imunomodulador ainda não foi completamente elucidado, porém a depleção de triptofano pode ser uma explicação, devido ao fato deste aminoácido ser essencial para a síntese de proteínas e, portanto para a proliferação celular (MUNN et al., 1998).

O triptofano é um aminoácido essencial proveniente da alimentação, é transportado para o fígado através do sistema porta onde é metabolizado, gerando compostos biologicamente ativos através de duas vias, a via serotoninérgica e a via das quinureninas.

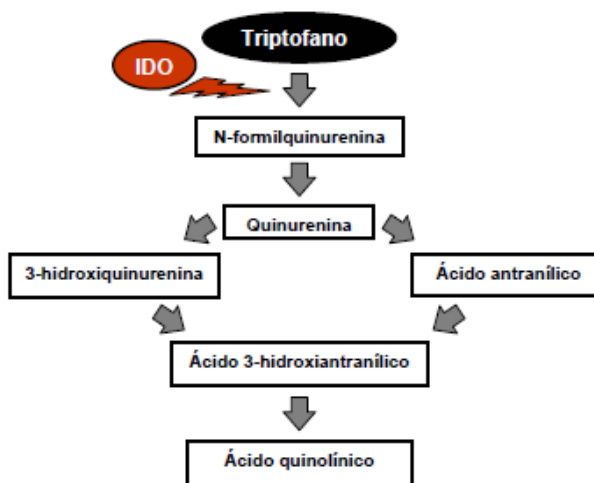
A via serotoninérgica sintetiza a serotonina (5-HT) através das enzimas triptofano hidroxilase (TPH) e aminoácido aromático descarboxilase (AADC). Este composto atua como neurotransmissor e atua em uma variedade de desordens de comportamento em seres humanos incluindo depressão e ansiedade. Há também evidências que este agente participe do crescimento e diferenciação celular neuronal. Outras funções descritas são o controle do sistema gastrointestinal, agregação plaquetária, e regulação do músculo liso cardiovascular. Em algumas células há síntese de melatonina (MLT) a partir de 5-HT envolvendo outras duas enzimas a arilalquilamina N- acetiltransferase (ANAT) e a hidroxiindol o- metiltransferase

(HIOMT). O MLT é um hormônio que participa do controle do ciclo circadiano, possui também propriedades imunomoduladoras, antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais devido as suas ações onco-estática (ALLEGRA et al., 2001; LISSONI et al., 2001; BARTSCH,BARTSCH; KARASEK, 2002; PUGAZHENTHI et al., 2008).

A principal via de metabolização do triptofano é a via das quinureninas. Nessa via é utilizado 95 a 99% do triptofano ingerido pela dieta que não foi utilizado para síntese proteica. Estudos mais recentes têm demonstrado que o efeito imunomodulador daIDO não se limita apenas a depleção do triptofano, mas também aos metabolitos que são gerados a partir desta via mais especificamente os derivados da quinurenina, representados na figura 1.

Na via das quinureninas, a formação de N-formilquinurenina (NFK) é realizada através das enzimas, triptofano 2,3 dioxigenase (TDO) e da IDO. A NFK é rapidamente degradada até à quinurenina e os subprodutos de seu metabolismo estão associados à ações tolerogênicas de células dendríticas e tumores além de promover efeitos citotóxica em células B e natural Killer (LARSSON et al., 1989; GAJEWSKI; MENG; HARLIN, 2006; KATZ; MULLER; PRENDERGAST, 2008).

Além de inibir a proliferação, os derivados da quinurenina induzem apoptose em linfócitos T “in vitro” além de suprimirem timócitos “in vivo” (FALLARINO et al., 2002). Estudos com transplante de pele em ratos demonstrou que administração de metabolitos de quinurenina aumenta a sobrevida do enxerto, provavelmente através da supressão de linfócitos T (BAUER et al., 2005).



Fonte: Adaptado. DELLE,H. **Indução da expressão da molécula indoleamina 2,3 dioxigenase(IDO) como terapia gênica em transplante experimental de ilhotas pancreáticas.** 2007.113 f. Tese (Doutorado em Ciência) - Faculdade de Medicina, Universidade de são Paulo, 2007.

Figura 1. Degradação do aminoácido triptofano a partir da ação da IDO.

A tabela 1 apresenta os principais mediadores envolvidos na expressão de IDO. A Figura 2 ilustra os mecanismos envolvidos na ação tolerogênica de IDO devido a diminuição de triptofano e aumento de compostos como quinurenina e 3-hidroxiquinurenina e ativação de linfócitos T reguladores e células dendríticas supressoras, criando um mecanismo imunomodulador que propicia a indução da tolerância imunológica.

Tabela 1 - Principais mediadores responsáveis pela indução de IDO

Mecanismo de ação	Indução da expressão de IDO
Citocinas Inflamatórias	INF- γ
	INF – α
	INF- β
	TNF – α
	IL – 2
	IL-4
	IL-6
	IL-10
	TGF- β
	LPS
	PGE2
	Receptores

Fonte: (DEL PRETE et al., 1993; BORISH, 1998; GRUTZ, 2005; CHEN, 2011).

TNF – interferon, TNF – Fator necrose tumoral, IL – Interleucina,
PGE2 – Prostaglandina E2, TGF- fator crescimento tumoral ,
LPS – Lipopolissacarídeo

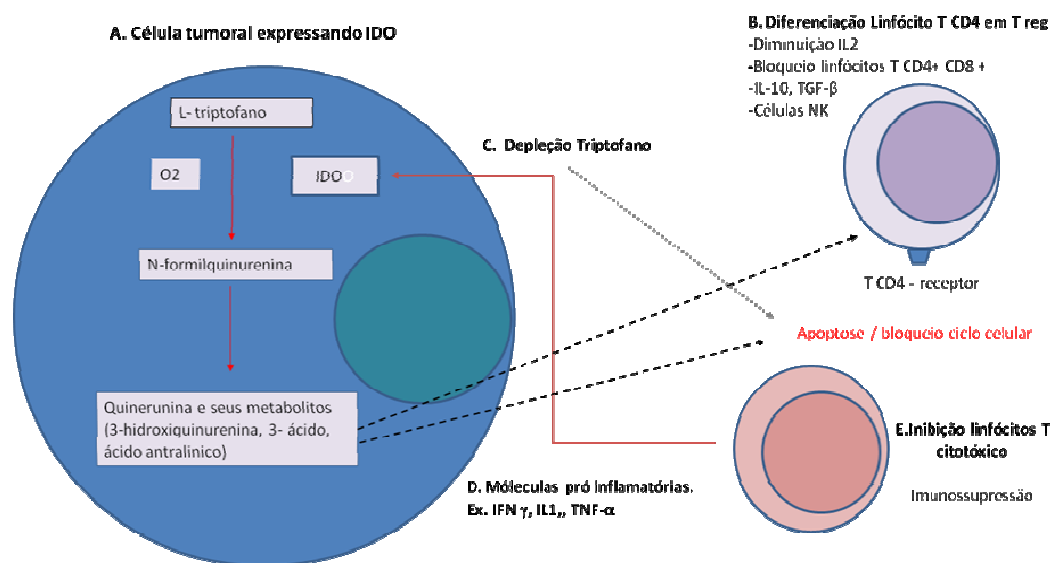
As células T reguladoras são capazes de modular a resposta imune através diminuição da produção de IL-2 bloqueando o ciclo celular de linfócitos T CD4+ CD8+ bem como de células apresentadoras de antígenos e NK por meio do contato celular, ou pela ação de citocinas como IL-10 e o TGF- β (FALLARINO et al.; 2006; JIA et al., 2009).

A IL-10 é uma citocina secretada por diferentes grupos celulares como linfócitos Th2, células T reguladoras, macrófagos, linfócitos B, células dendríticas, age suprimindo as funções das células apresentadoras de antígenos, inibindo a produção de IL-2 e a sinalização intracelular via molécula CD28, evitando expressão clonal dos linfócitos (ASKENASY et al., 2008; MOORE et al., 2001; TRINCHIERI et al., 2001). Além disso, a IL-10 inibe a produção

de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 por monócitos e macrófagos (DEL PRETE et al., 1993; BORISH, 1998; GRUTZ, 2005).

O TGF- β é capaz de inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos CD4⁺ sem induzir sua morte por apoptose. Além disso, esta citocina juntamente com IL-10, inibem as funções Th1 efetoras (CHEN, 2011; PALLOTA et al.; 2011).

Corroborando com a concepção de que os mecanismos imunorregulatórios atuam juntamente com os mecanismos pró-inflamatórios, observou que a expressão da IDO é induzida pelos níveis de IFN- γ local, outros fatores como IL1- β , IL-10, TNF- α , TNF- β e LPS também induzem a expressão de IDO, porém num patamar inferior ou de forma sinérgica com INF- γ (MOFFET et al., 2003; MUNN et al., 2007).



Fonte: (LEANDRO R.M, 2014)

Figura 2. Mecanismo tolerogênico da IDO. **A.** Via das quinureninas. **B.** Ativação linfócitos T reguladores (Treg) diminuição da produção de IL-2 e aumento da produção IL-10 e TGF- β , bloqueio do ciclo celular de linfócitos T e células apresentadoras de antígenos e Natural Killer (NK). **C** Depleção Triptofano e aumento dos metabolitos da via da quinurenina induz bloqueio no ciclo celular e apoptose. **D.** Indução de IDO frente a exposição de mediadores inflamatórios interferon- γ (IFN- γ), IL1, fator de necrose tumoral (TNF- α). **E.** Inibição resposta imune celular.

A capacidade supressora de IDO sobre uma variedade de tipos celulares do sistema imune, particularmente linfócitos, tem atraído o interesse de pesquisadores no estudo da regulação da IDO, como uma possível via de tratamento de várias doenças em seres humanos como esclerose múltipla, artrite reumatoide, Alzheimer, transplantes de órgãos e o câncer

(BOASSO et al., 2007; MUNN et al., 2007; JIA; TIAN; DING, 2009; MULLEY; NIKOLIC-PTERSON, 2008).

Hayashi et al. (2004) estudando modelo de transplante de pâncreas em camundongos demonstraram que a enzima IDO exerce um importante efeito supressivo, inibindo a rejeição mediada por linfócitos T. No modelo de asma experimental desenvolvido em camundongos foi observada a correlação entre o aumento da expressão da enzima IDO nas células presentes nos pulmões e a inibição da hiper-reatividade mediada por linfócitos T (ALEXANDER et al., 2002).

Estudos demonstram que a IDO tem importante ação antimicrobiana e anti-inflamatória. A expressão de IDO, induzida nos sítios inflamatórios *in vivo* principalmente por IFN- γ é considerada parte da resposta imune inata do hospedeiro contra inflamações crônicas e infecções persistentes, tendo como função impedir o crescimento de vírus, bactérias, patógenos intracelulares e células tumorais via depleção de triptofano (PFEFFERKORN et al., 1984; SANNI et al., 1998; BEATTY et al., 1993, MACKENZI et al., 1998; SILVA et., 2002; HAYASHI., 2004; MELLOR et al., 2004).

A presença e ativação de IDO em alguns tipos tumorais representam um dos mecanismos pelo qual as células tumorais podem escapar do sistema imune. Vários estudos têm sugerido que a expressão de IDO pode levar ao escape imunológico do câncer de mama em camundongos (MULLER et al., 2005) e a presença de células dendríticas IDO⁺ nos linfonodos sentinelas adjacentes as neoplasias, bloqueiam as células T tumor-específicas e converte células T CD4⁺ à Treg (FALLARINO et al., 2006).

Lyon et al. (2011) comparou a concentração sérica de triptofano e quinurenina em mulheres com câncer de mama e sem câncer de mama. O autor observou que houve um menor nível plasmático de triptofano e aumento significativo nos níveis de quinurenina nas pacientes portadoras de neoplasias mamárias sugerindo que no câncer de mama há uma estimulação da atividade de IDO, levando a uma maior degradação de triptofano e consequentemente produção de seus metabólitos.

O 1-metil-triptofano (1MT) tem a capacidade de inibir a atividade da IDO, bloqueando seu efeito imunossupressor através do aumento de células Th1 e uma diminuição de células Th2 e células T reguladoras (MELLOR, MUNN, 2001; UYTENHOVE et al., 2003; MULLER et al., 2005; POTULA et al., 2005). Esse agente restaura a proliferação de células T aumentando as respostas desta célula contra os antígenos tumorais inibindo o catabolismo do triptofano e consequentemente diminuindo a produção de catabólitos, como a quinurenina, (GROHMANN et al., 2001, HWU et al., 2000; MELLOR et al., 2003).

Estudos apontam que a utilização de 1MT diminui consideravelmente a velocidade de crescimento celular “*in vitro*” para o carcinoma de pulmão em modelo experimental murino. (FRIBERG et al., 2002; UYTENHOVE et al., 2003; MULLER et al, 2005). Muller et al. (2005) avaliou a utilização do 1MT em associação com agentes quimioterápicos em neoplasias mamárias em camundongos e constatou que houve considerável redução do crescimento tumoral. O autor conclui que existe uma importante interação sinérgica entre os agentes.

No futuro, estudos prospectivos com imunoterapia tem como desafio desenvolver estratégias que possam efetivamente superar a imunossupressão induzida pelos tumores, aumentando assim, respostas antitumorais. Um fármaco que bloqueie a IDO pode ser clinicamente útil na reversão desta imunossupressão (MELLOR; MUNN 2001; UYTENHOVE et al., 2003; MULLER et al., 2005; POTULA et al., 2005; RUTELLA et al., 2006).

3. Capítulo I

EXPRESSÃO DA ENZIMA INDOLEAMINA-2,3-DIOXIGENASE EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CÃES

RESUMO

As neoplasias mamárias malignas são comuns em cães, e constituem o neoplasma mais frequente em cadelas não castradas. A indoleamina- 2,3 – dioxigenase (IDO) é uma enzima expressa por diversas células do organismo e, dentre suas muitas funções, atua principalmente na regulação do sistema imune. A presença e ativação de IDO em alguns tipos tumorais representam um dos mecanismos pelo qual as células tumorais podem se evadir do sistema imune, facilitando a indução, crescimento e progressão tumoral. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil epidemiológico e anatomopatológico de 21 animais portadores de neoplasias mamárias, além de verificar, pela técnica de imuno-histoquímica a expressão de IDO. As neoplasias malignas corresponderam a 86% dos casos e o principal diagnóstico histopatológico encontrado foi o carcinoma simples. No que concerne à idade, todos os animais apresentaram idade média igual a $10,3 \pm 3,3$ anos. Na análise imuno-histoquímica os resultados mostraram que todas as amostras apresentaram imunomarcção citoplasmática para IDO confinado principalmente nas células localizadas nos ductos mamários. Células inflamatórias como macrófagos e linfócitos presentes no estroma tumoral também apresentaram imunomarcção para IDO. Atualmente, na medicina veterinária procuram-se novas estratégias e alvos terapêuticos para a modulação da resposta antitumoral em pequenos animais. A IDO é um candidato potencial para uma abordagem complementar no tratamento de neoplasias mamárias

Palavras-Chave: Cães. Neoplasia. mamária. IDO. Imuno-histoquímica.

EXPRESSION OF THE ENZYME INDOLEAMINE-2,3-DIOXYGENASE IN MAMMARY TUMORS OF DOGS

ABSTRACT

Mammary gland tumors are common in dogs and are the most common type of neoplasm of uncastrated female dogs. The indoleamine-2, 3 - dioxygenase (IDO) is an enzyme expressed on many cells and among its functions acts mainly in regulation of the immune system. It relies on the tryptophan catabolism, whose depletion induces cell cycle arrest of T lymphocytes turning these cells more sensitive to apoptosis, in addition to some down-stream tryptophan-derived metabolites that would increase IDO activity. The presence and activation of IDO in some tumor types represents a mechanism by which tumor cells can evade the immune system, thus facilitating the induction and progression of tumor growth. Our aim was to evaluate 21 animals with mammary tumors and to verify, by immunohistochemistry, cells expressing IDO. Malignant neoplasms accounted for 86% of the cases and the most common diagnosis was carcinoma simple. All animals were adult females, with mean age of 10.3 ± 3 years. Immunohistochemistry results showed that all samples presented cytoplasmic immunostaining for IDO confined mainly in cells located in the mammary ducts. Inflammatory cells such as macrophages and lymphocytes present in the tumour stroma also expressed IDO. Currently, veterinary medicine seeks new strategies and compounds for modulating the antitumor response in small animals. IDO is a potential candidate for complementary approach for the treatment of mammary neoplasms.

Keywords: Dogs. Mammary neoplasia. IDO. Immunohistochemistry

3.1. INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias são, entre todos os tipos de tumores, os mais comumente diagnosticados na fêmea canina especialmente nas cadelas não castradas, e os tipos malignos variam, em ocorrência, de 26 a 73% (MARIA; SOBRAL; DALECK., 1998; DE NARDI et al., 2002).

A indoleamina- 2,3 – dioxigenase (IDO) é uma enzima expressa por diversas células do organismo e, dentre suas muitas funções, atua principalmente na regulação do sistema imune. Esta se baseia no catabolismo do triptofano, cuja depleção induz uma interrupção do ciclo celular em linfócitos T, tornando-os mais sensíveis a apoptose aliado à ação de metabólitos provenientes desta reação os derivados da quinurenina que potencializariam a atividade da IDO. A presença e ativação de IDO em alguns tipos tumorais representam um dos mecanismos pelo qual as células tumorais podem se evadir do sistema imune, facilitando a indução, crescimento e progressão tumoral (MUNN et al, 1998; MULLER et al., 2005).

Devido à sua relevância neste contexto, aliado à elevada incidência de neoplasia mamária e à extrema carência de informação na literatura veterinária a respeito dos conceitos relacionados à imunovigilância e imunoedição, este estudo visa caracterizar a expressão da IDO nas neoplasias mamárias malignas de cães por meio da reação de imunohistoquímica, observando o perfil epidemiológico e classificação anatomopatológica.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo deste estudo foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, protocolo n° 2530/2012.

3.2.1 Casuística

Os critérios de elegibilidade para o presente estudo foi à escolha de cães de qualquer raça, sexo e idade, portadores de neoplasias mamárias localizadas em qualquer mama ou cadeia mamária, atendidos no Serviço de Cirurgia de Pequenos animais da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro referentes ao período de Janeiro de 2012 a Agosto de 2013. Foram selecionados 21 casos, os animais selecionados foram apresentados no quadro 1

Todos os proprietários foram esclarecidos quanto aos procedimentos adotados para a realização desta pesquisa e autorizaram formalmente, por escrito, a permissão que consiste no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para utilização do material biológico colhido a partir de seus animais (anexo 1).

Inicialmente foi realizada anamnese com os proprietários dos animais selecionados por meio de um questionário (anexo 2), seguido de avaliação física, caracterização macroscópica da neoformação e pesquisa de metástase à distância por meio da radiografia torácica e ultrassonografia abdominal.

Como critério de inclusão para o procedimento cirúrgico, principalmente como avaliação pré cirúrgica foram considerados valores hematológicos como eritrócitos $\geq 3.500.000/\text{mm}^3$, leucócitos $\geq 6.000/\text{mm}^3$, concentração sérica de creatinina $\leq 2 \text{ mg/dl}$.

Imediatamente após a realização da mastectomia foram coletadas amostras do tumor e conservados em formol 10% tamponado para posterior classificação histopatológica e avaliação da expressão de IDO pela reação de imuno-histoquímica.

Quadro 1 - Distribuição dos cães com neoplasia mamária segundo número do caso, sexo, raça, idade, e diagnóstico morfológico. São Paulo Janeiro. 2012 - Agosto. 2013.

Casos	Raça	Idade	Sexo	Diagnóstico morfológico
1	SRD	10	Fêmea	Carcinoma túbulo papilífero grau I
2	Cocker	10	Fêmea	Carcinoma túbulo papilífero grau II
3	SRD	17	Fêmea	Carcinoma sólido grau I
4	SRD	8	Fêmea	Carcinoma complexo grau II
5	SRD	10	Fêmea	Carcinoma tubular grau I
6	SRD	10	Fêmea	Carcinoma tubular grau II
7	SRD	10	Fêmea	Carcinoma tubular grau II
8	SRD	13	Fêmea	Carcinoma tubular grau II
9	Dachshund	15	Fêmea	Carcinoma sólido anaplasico/Carcinoma simples túbulo papilar grau II
10	SRD	7	Fêmea	Carcinoma tubular grau II
11	Poodle	16	Fêmea	Carcinoma misto grau I
12	Cocker		Fêmea	Adenoma misto
13	Labrador	6	Fêmea	Carcinoma tubular grau II
14	SRD	12	Fêmea	Carcinoma túbulo papilífero grau I
15	SRD	7	Fêmea	Carcinoma túbulo papilífero grau I
16	Boxer	9	Fêmea	Carcinoma complexo grau I/Carcinoma e epitelioma maligno grau I
17	SRD	S.I*	Fêmea	Carcinoma complexo grau I/Carcinoma e epitelioma maligno grau I
18	SRD	7	Fêmea	Carcinoma mioepitelioma maligno grau I
19	SRD	S.I*	Fêmea	Adenoma misto
20	SRD	S.I*	Fêmea	Carcinoma complexo grau I
21	SRD	S.I*	Fêmea	Carcinoma complexo grau I

Fonte: (HOVET- UNISA, LEANDRO R.M, 2014)

*S.I sem informação

3.2.2 Avaliação anatomopatológica

Após o procedimento cirúrgico, os dados macroscópicos das neoplasias foram considerados a partir da descrição do cirurgião que originalmente examinou a peça cirúrgica e pelo questionário realizado com proprietário do animal. Os parâmetros macroscópicos analisados foram: tamanho da neoformação em centímetros e localização.

A confecção dos blocos de parafina dos casos selecionados foi realizada no Setor de Anatomia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os blocos foram cortados em micrótomo, com espessura de 5 μm . Após a obtenção dos cortes, os mesmos foram colocados em lâminas histológicas e permaneceram 24 horas em estufa à 55 e 58°C. Posteriormente a coloração por hematoxilina e eosina foi realizada para exame em microscópio de luz nos aumentos de 40x, 100x e 400x. O diagnóstico morfológico das neoplasias foi baseado na classificação histológica para neoplasias mamárias em cães proposta pelo autor (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

3.2.3. Estudo imuno-histoquímico

Após a caracterização morfológica os fragmentos foram submetidos ao exame imuno-histoquímico. O método empregado foi estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). O processamento foi realizado no Laboratório de Técnicas Imunológicas Aplicadas a Morfofisiologia (LTIAM) no Setor de Anatomia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. O anticorpo primário utilizado foi o Anti-IDO (policlonal, Cód. EB06950, Diluição.1:500 Espécie.cabra) produzido pela Everest Biotech.

O processamento dos blocos de parafina inclui corte em micrótomo com espessura de 5 μm e adesão dos fragmentos obtidos em lâminas de vidro previamente tratadas com o adesivo organossilano (Sigma, St. Louis, EUA, A3648) e mantidos em estufa a 60 °C por 24 horas.

A seguir, os cortes foram submetidos à desparafinização com dois banhos de xilol e posterior hidratação em álcool etílico absoluto em concentrações decrescentes, lavagem em água corrente seguida por lavagem em PBS pH 7,4.

Para a recuperação antigênica foi utilizado forno de micro-ondas com potência máxima durante 15 minutos com as lâminas incubadas em solução tampão de Citrato 10M, pH 6,0 cujo propósito foi liberar os epítomos do tecido, bloqueados pela solução fixadora. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado em câmara escura com incubação do Kit Peroxidase Block 3% (Pring Bioscience, Cat. N° DPB-125) durante 10 minutos em temperatura ambiente. A etapa seguinte foi a incubação do anticorpo primário na diluição proposta. A incubação permaneceu 24 horas, overnight a 4° C em câmara úmida.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS pH 7,4 e incubadas com anticorpo secundário biotilado universal por 15 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida. O sistema de detecção escolhido foi universal LSAB *plus* (Dako, cod K0690-1). Esta etapa teve a duração de 15 minutos em temperatura ambiente e câmara úmida. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em três ciclos de 5 minutos em PBS pH 7,4.

A reação imune foi revelada com solução cromógena de diaminobenzidina (DAB, 3,3'- diaminobenzidine, Sigma cod. D5637). O tempo mínimo de revelação foi de 1 minuto com bloqueio em água. Por fim, os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos, contracorados com Hematoxilina de Harris por 10 segundos ou menos, lavados abundantemente em água corrente, desidratados em etanol, cujas soluções estavam em concentração crescente. A montagem das lâminas foi feita com resina Permount® (Fischer scientific, cod SP 15-1000).

Todas as reações tiveram controles positivo e negativo para atestar a veracidade das mesmas. O controle positivo foi placenta murino. Já para os controles negativos foi realizada apenas a incubação de PBS e eliminação do anticorpo primário, sendo efetuados todos os demais procedimentos imuno-histoquímicos.

Para a avaliação da intensidade da imunomarcção, foram estabelecidos escores, conforme ilustrado na tabela 2, sendo consideradas positivas todas as células neoplásicas e inflamatórias com evidências de marcação citoplasmática mesmo que fracas, excluindo células endoteliais conforme elaborado por Solimman et al. (2013).

Tabela 2 – Escore de Intensidade da imunomarcção das neoplasias mamárias submetidas reação imuno-histoquímica pelo com anticorpo anti-IDO

Parâmetros	Escore
Ausência de marcação	0
Marcação fracas	1
Marcação moderada	2
Marcação forte	3

Fonte: (SOLIMMAN et al. 2013).

Os resultados obtidos foram avaliados em microscópio Nikon Eclipse E 800 equipado com câmera digital de captura Col SNAP-Pro Media Cybernetics® nos aumentos 40x, 100x e 400x.

Como não há estudos na medicina veterinária descrevendo e avaliando a expressão imuno-histoquímica de IDO em neoplasias de pequenos animais, preconizou a realização do teste de *Western Blot* em quatro casos de carcinoma mamário túbulo papífero grau I para verificar se as imunomarcações encontradas na avaliação imuno-histoquímica eram específicas para enzima IDO.

3.2.4. Extração de proteínas e quantificação

A proteína total foi extraída de, aproximadamente 40 mg de tecido tumoral congelado em nitrogênio líquido. Sob refrigeração as amostras foram incubadas em 400 µl de solução 2x *sample buffer* (SDS 4%; Tris-HCL 120 mM pH=6,8; glicerol 20%; H₂O destilada autoclavada) e trituradas com macerador de tecido durante 6 segundos. Depois foi adicionado igual volume da solução *Working solution* (2 x *Sample Buffer*; DTT 100 mM; PMSF 1 mM; H₂O destilada autoclavada) e as amostras foram centrifugadas a 13000rpm, durante 15 minutos e 4 °C.

O sobrenadante foi recolhido e a concentração de proteínas foi determinada em biofotômetro (Eppendorf, Hamburg, Germany)

3.2.5. Western blot

As proteínas totais extraídas do tecido foram submetidas à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (12% em SDS). Em seguida as proteínas foram transferidas durante 7 minutos (*I-Blot, Invitrogen*) para membranas de difluoreto de polivinilideno (PDVF) ou nitrocelulose. O bloqueio das reações inespecíficas nas membranas foi realizado com solução de *Skin Milk* 5% diluído em TTBS, durante 2 horas em temperatura ambiente e sob leve agitação. Para a marcação da IDO, foi utilizado anticorpo policlonal anti-IDO (Cód. EB06950, Diluição.1:500 em TTBS contendo 5% de *skin Milk*).

As membranas foram incubadas à 4 °C. *overnight*, sob leve agitação. Após lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários de cabra anti-coelho, conjugados com peroxidase (Santa Cruz, 1:1000 em TTBS contendo 5% de *Skin Milk*). A ligação foi revelada com uma solução contendo diaminobenzina (sigma), sulfato de níquel e peróxido de hidrogênio. A membrana foi escaneada e incubada novamente com anticorpo monoclonal anti- β -actinina (Sigma 1:500 em TTBS contendo 5% de *Skin Milk*), utilizada como controle endógeno tecidual para garantir que todas as amostras corridas no gel de poliacrilamida possuíam a mesma quantidade inicial de proteína.

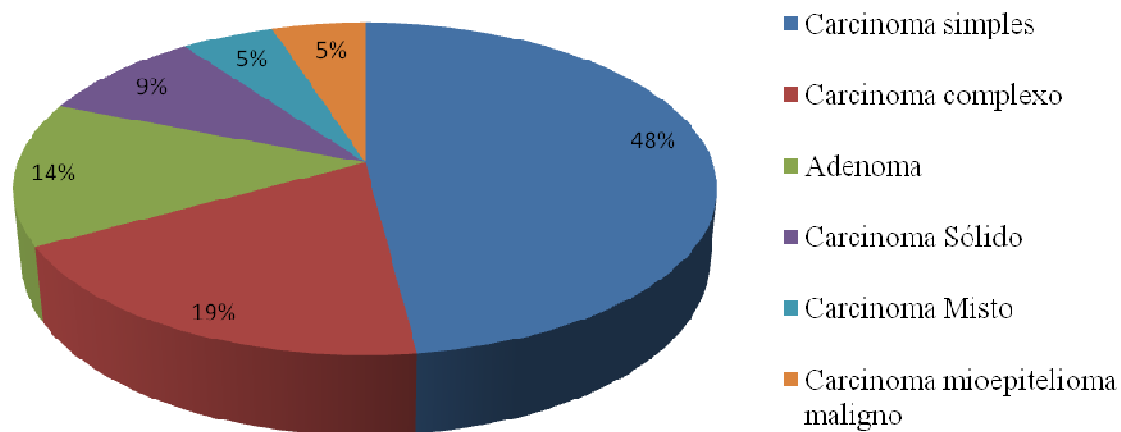
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros clínicos e epidemiológicos foram analisados descritivamente, com apresentação em forma de frequência absoluta (n), frequência relativa (%) e/ou média e desvio-padrão.

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Distribuição dos animais quanto ao diagnóstico morfológico das neoplasias mamárias

Dentre os 21 cães avaliados, as neoplasias mamárias malignas corresponderam 86% (18/21) dos casos, enquanto que 14% (3/21) eram neoplasias benignas. Os principais diagnósticos morfológicos encontrados foram 48% (10/21) carcinoma simples, 19% (4/21) carcinoma complexos, 14% (3/21) adenoma misto, 9 % (2/21) carcinoma sólido 5% (1/21) carcinoma misto e 5% (1/21) carcinoma mioepitelial maligno, conforme foi ilustrado na figura 3.



Fonte: (LEANDRO R.M, 2014)

Figura 3 - Distribuição dos diagnósticos morfológicos dos animais portadores de neoplasias mamárias, São Paulo - Janeiro. 2012 - Agosto. 2013.

3.4.2. Caracterização dos cães segundo o sexo, idade e raça

No que concerne a idade, todos animais do presente estudo eram adultos do sexo feminino, com idade média de $10,3 \pm 3,3$ anos. Os animais SRD foram os mais acometidos. A distribuição segundo as raças esta ilustrada na tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição das principais raças dos com neoplasia mamária.
São Paulo - Janeiro. 2012 - Agosto. 2013

Neoplasias		
Raça	Casos	%
SRD ¹	15	71
Cocker	2	9,5
Labrador	1	4,7
Boxer	1	4,7
Poodle	1	4,7
Dachshund	1	4,7

¹ SRD= sem raça definida

Fonte: (LEANDRO R.M, 2014)

3.4.3 Caracterização laboratorial

Os parâmetros laboratoriais encontrados estavam dentro do limite de normalidade em todos pacientes. Os resultados encontrados foram apresentados na tabela 4

Tabela 4 – Distribuição dos resultados laboratoriais dos animais portadores de neoplasias mamárias, média, desvio padrão (DP), valores mínimo e máximo– São Paulo – Janeiro. 2012 - Agosto. 2013.

Exame ¹	Neoplasias		
	Média ± DP ^{&}	Mínimo	Máximo
Hematócrito	41,5 ± 5,1	32	49
Hemácias	6,0 ± 0,6	4,7	6,8
Hemoglobina	13,8 ± 2,1	10,3	16,7
Leucócitos	13,2 ± 4,7	7,4	22,9
Plaquetas	311 ± 68,5	68,7	531
Albumina	2,9 ± 0,7	2,6	3,7
Proteína total	7,6 ± 1	6,2	9,8
Ureia	29,9 ± 11	0,7	132
Creatinina	1,0 ± 0,4	0,5	1,4
ALT*	57 ± 32	20,9	146
FA [#]	129,6 ± 49	95	224,6

Fonte: (LEANDRO R.M, 2014)

¹Hematócito %, Hemácias milhões/ mm³, Hemoglobina g/dl, leucócitos x1000/mm³, plaquetas x1000/mm³, albumina g/dL, proteína total g/dL, uréia mg/d, Creatinina mg/dL, *Alanina amino transferase U/L, [#] Fosfatase alcalina U/L, [&]DP=Desvio Padrão

3.4.4. Localização anatômica

Em relação à localização anatômica das neofomações na cadeia mamária, 43% (9/21) estavam localizadas na mama inguinal e mama abdominal cranial, 33% (7/21) na mama torácica caudal, 14% (3/21) abdominal caudal e 10 % (2/21) na torácica cranial. A tabela 5 apresenta a distribuição das neoplasias segundo sua distribuição anatômica.

Tabela 5 - Distribuição anatômica das neofomações na cadeia mamaria, São Paulo - Janeiro. 2012 – Agosto. 2013.

Localização cadeia mamária	N (%)
Mama Torácica Cranial	9,5%
Mama Torácica Caudal	14%
Mama Abdominal Cranial	33%
Mama Abdominal Caudal	9,5%
Mama Inguinal	43%

Fonte: (LEANDRO R.M, 2014)

3.4.5.Tamanho

A tabela 6 apresenta o tamanho médio (cm) das neofomações nas diferentes mamas. As formações localizadas na mama inguinal foi a que apresentou maior tamanho $2,7 \pm 3,6$ cm, seguido pela mama abdominal cranial $2,6 \pm 6,3$ cm, torácica caudal $2 \pm 1,9$ cm, torácica cranial $1,75 \pm 2,17$ cm e abdominal caudal $1,3 \pm 0,46$ cm.

Tabela 6 - Distribuição do tamanho das neofomações (cm) nas mamas, São Paulo - Janeiro. 2012 - Agosto. 2013.

Localização cadeia mamária	Tamanho (cm)	DP *
Mama Torácica Cranial	1,75	2,17
Mama Torácica Caudal	2	1,9
Mama Abdominal Cranial	2,6	6,3
Mama Abdominal Caudal	1,3	0,46
Mama Inguinal	2,7	3,6

Fonte: (LEANDRO R.M, 2014)

* DP=Desvio Padrão

3.4.6. Avaliação imuno-histoquímica.

Todas amostras avaliadas apresentaram imunomarcção para o anticorpo anti-IDO. As imunomarcções foram validadas pelo teste *Western Blot*.

A figura 4 mostra a banda de IDO localizada 25 KD, o certificado comercial do fabricante do anticorpo EB06950 produzido pela Everest Biotech, indica que a IDO deve ser identificado entre 25 KD e 28 KD. O caleidoscópio utilizado foi BIO-RAD catálogo 161-0324. Este resultado certifica que as imunomarcções encontradas são específicas para IDO.



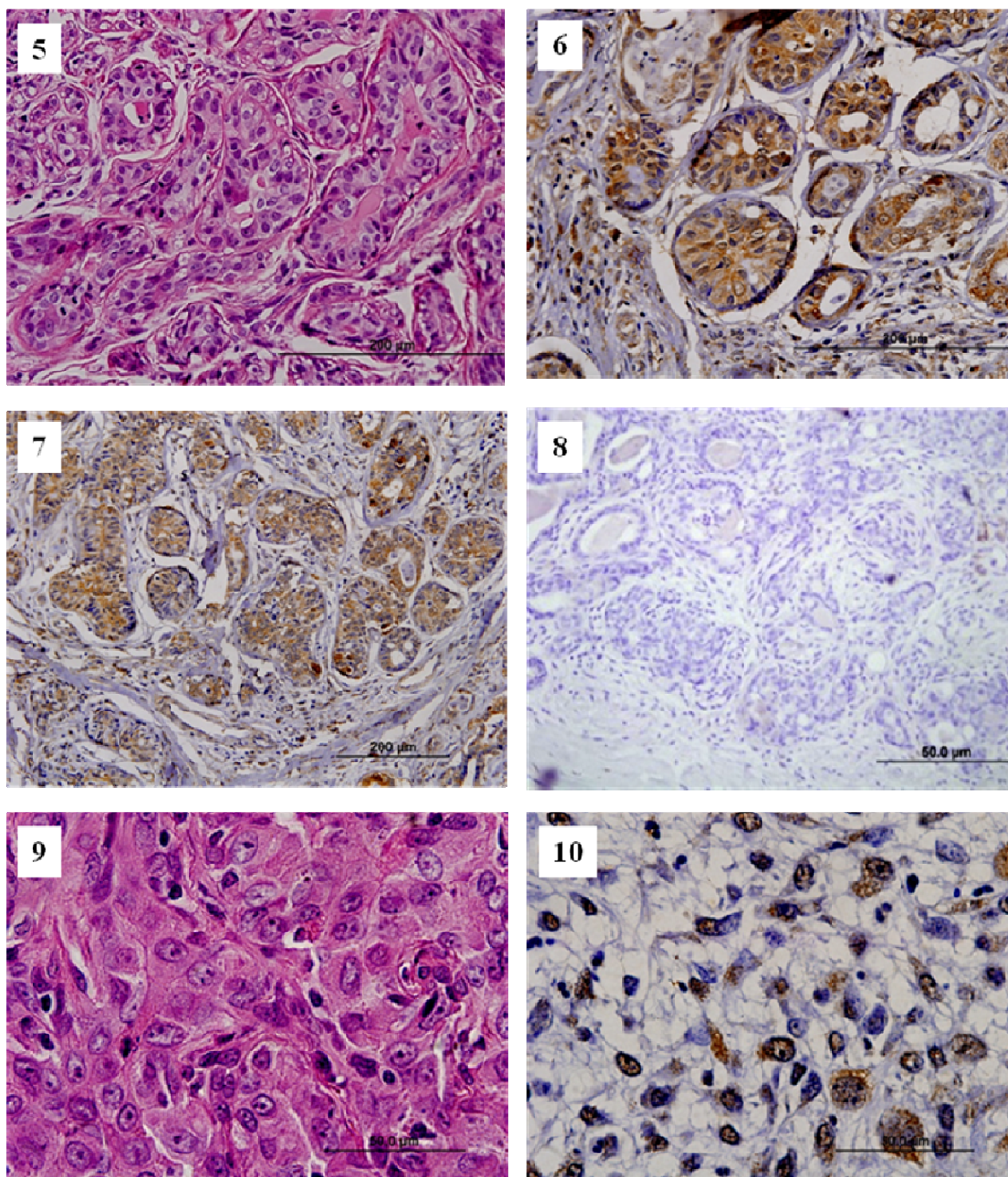
Fonte: (LEANDRO R.M, 2014)

Figura 4 – Western Blot de um carcinoma túbulo papilífero grau I. Fotografia de membrana de PVDF demonstrando a presença de proteínas com massa molecular entre 17,26KD e 32,01KD.

Em relação à distribuição da imunomarcação, 100% (21/21) dos casos apresentaram marcação citoplasmática confinada, principalmente nas células localizadas nos ductos mamários conforme ilustrado nas figuras 6, 7 11, 12.

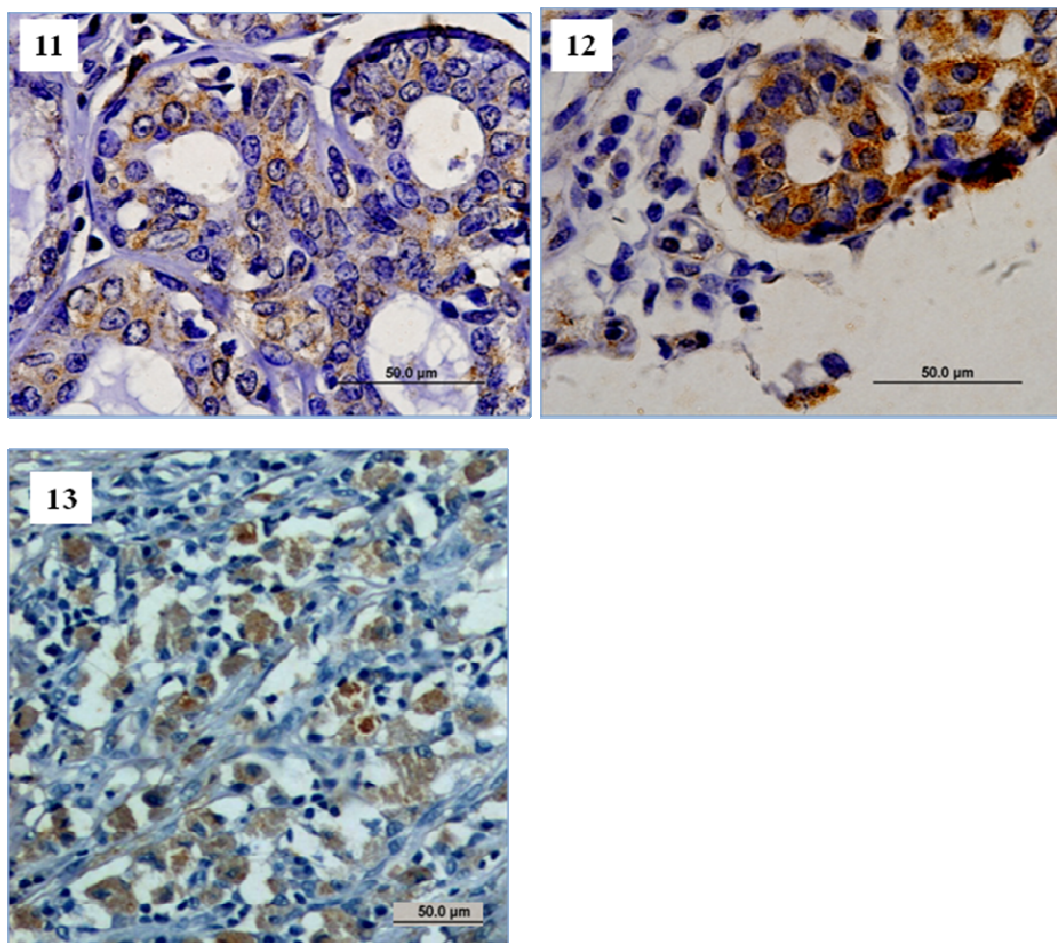
A tabela 5 ilustra a diferença no escore de intensidade de marcação entre as células ductais atípicas e células bem diferenciadas. As células atípicas apresentaram baixo escore de marcação variando de 0 a 1. A figura 11 ilustra um carcinoma túbulo papilífero grau II, a área em destaque na fotomicrografia destaca um túbulo composto por um grupo de células apresentando atipia e moderado pleomorfismo nuclear. Note que neste caso, as células ductais atípicas apresentaram marcação citoplasmática muito fraca, justificando seu baixo escore. Em contrapartida em casos onde a morfologia celular apresentava características bem diferenciadas como no caso do carcinoma mioepitelial maligno grau 1 ilustrado na figura 12, nestes casos os escores de marcação foram superiores variando de 1 a 3.

Outro achado peculiar restrito as células atípicas, foi a presença de pequenos grânulos intracitoplasmáticos, conforme ilustrado pela figura 10. Este achado não foi encontrado em nenhuma célula com características bem diferenciada. Células inflamatórias mononucleares representadas pelos macrófagos e linfócitos foram observadas no estroma tumoral em 42% (9/21) dos casos e também apresentaram marcação positiva para IDO conforme ilustrado na figura 13.



Fonte: (LEANDRO R.M, 2014)

Figura 5 – Fotomicrografia Carcinoma túbulo papilífero grau II. HE, Bar. 200 µm, **Figura 6** - Fotomicrografia Carcinoma túbulo papilífero grau II. Imunomarcção para IDO localizado nos túbulos mamários. Técnica Estreptavidina-biotina- peroxidase contra corada por Hematoxilina de Harris. IHQ, Bar.200 µm. **Figura 7** - Fotomicrografia Carcinoma túbulo papilífero grau I. Imunomarcção para IDO localizado nos túbulos mamários. Técnica Estreptavidina-biotina- peroxidase contra corada por Hematoxilina de Harris. IHQ, Bar.200 µm. **Figura 8** - Fotomicrografia Carcinoma túbulo papilífero grau I. Controle negativo para IDO. Estreptavidina-biotina- peroxidase contra corada por Hematoxilina de Harris. IHQ, Bar. 200 µm **Figura 9** - Fotomicrografia carcinoma sólido I. Observar células atípicas, pleomorfismo celular e anisocariose HE, Bar.50 µm. **Figura 10** - Fotomicrografia carcinoma sólido. Observar nas células a presença de múltiplos grânulos intracitoplasmáticos. Imunomarcção para IDO. Técnica Estreptavidina-biotina peroxidase contra corada por Hematoxilina de Harris. Bar. 120 µm.



Fonte: (LEANDRO R.M, 2014)

Figura 11 - Fotomicrografia Carcinoma túbulo papilífero grau II. Células tubulares apresentando intensidade de imunomarcção fraca (Escore 1). Método Estreptavidina-biotina-peroxidase contra corada por Hematoxilina de Harris. IHQ, Bar. 50 µm. **Figura 12** - Fotomicrografia Carcinoma mioepitelioma maligno grau I. Células tubulares apresentando intensidade de imunomarcção forte (Escore 3). Método Estreptavidina-biotina-peroxidase contra corada por Hematoxilina de Harris. IHQ, Bar. 50 µm **Figura 13** - Fotomicrografia mostrando células mononucleares apresentando Imunomarcção para IDO + localizadas no estroma tumoral. Técnica Estreptavidina-biotina peroxidase contra corada por Hematoxilina de Harris. Bar. 50 µm.

Tabela 7 – Distribuição do escore de imunomarcção das células epiteliais, atípicas, macrófagos e linfócitos para o anticorpo anti-IDO

Diagnostico morfológico	Escore de imunomarcção			
	Epitelial*	Atípicas	Macrófagos	Linfócitos
Carcinoma túbulo papilífero grau I	1	1	2	0
Carcinoma túbulo papilífero grau II	3	0	1	0
Carcinoma sólido grau I	1	1 [#]	0	1
Carcinoma complexo grau II	1	1 [#]	1	1
Carcinoma tubular grau I	1	0	0	0
Carcinoma tubular grau II	3	1 [#]	0	1
Carcinoma tubular grau II	2	0	0	0
Carcinoma tubular grau II	2	0	1	2
Carcinoma sólido anaplásico/carcinoma simples túbulo papilar grau II	2	1 [#]	1	0
Carcinoma tubular grau II	2	1 [#]	1	2
Carcinoma misto grau I	1	0	0	0
Adenoma misto	3	0	0	0
Carcinoma tubular grau II	3	1	1	1
Carcinoma túbulo papilífero grau I	1	1 [#]	2	0
Carcinoma túbulo papilífero grau I	1	0	1	1
Carcinoma complexo grau I/ carcinoma e epiteloma maligno grau I	1	0	0	0
Carcinoma complexo grau I /carcinoma e epiteloma maligno grau I	1	1	0	1
Carcinoma mioepitelioma maligno grau I	1	1 [#]	0	0
Adenoma misto	1	0	0	0
Carcinoma complexo grau I	1	0	1	0
Carcinoma complexo grau I	1	0	0	0

Fonte: (LEANDRO R.M, 2014/

*Células epiteliais bem e moderadamente diferenciadas,

#Presença de grânulos intracitoplasmáticos

3.5. DISCUSSÃO

As neoplasias mamárias malignas foram as mais comumente diagnosticadas no presente levantamento correspondendo a 86% dos casos estudados, sendo o carcinoma simples o principal tipo histológico encontrado. A alta prevalência de carcinomas simples também foi observada por diversos autores como (DALECK et al., 1998; ZUCCARI; SANTANA; ROCHA., 2001; OLIVEIRA et al.,2003; KARAYANNOPOULOU et al., 2005). Já as neoplasias benignas foram observadas em 14% dos casos, o principal diagnóstico encontrado foi o adenoma misto.

Estudos multicêntricos internacionais evidenciaram que o percentual de neoplasias malignas foi inferior quando comparado aos resultados encontrados no presente estudo, correspondendo aproximadamente 54% dos casos (RUTTEMAN; WITHROW; MACEWEN, 2001; ITOH; UCHIDA; ISHIKAWA., 2005; SORENMO et al., 2009). Em contrapartida estudos nacionais observaram percentual de neoplasias malignas semelhantes aos nossos resultados e superior aos estudos internacionais correspondendo entre 68% e 91% (ZUCCARI;SANTANA; ROCHA., 2001; DE NARDI et al., 2002; MARTINS; TAMAGO; GUERRA., 2002; OLIVEIRA et al., 2003).

A diferença encontrada na prevalência de neoplasias malignas e benignas nos levantamentos internacionais e nacionais em parte pode ser explicada pela forma de colheita de dados. Estudos baseados na submissão de exames a laboratórios tendem a ter uma maior prevalência de neoplasias malignas, uma vez que muitos nódulos mamários pequenos, não são removidos precocemente e enviados ao patologista para avaliação e classificação devida (MORRIS et al., 1998). Por outro lado, outra possível causa para a alta prevalência das neoplasias malignas nos estudos realizados no Brasil é o tempo prolongado entre o aparecimento do tumor e a avaliação clínica (OLIVEIRA et al., 2003). Nos casos avaliados no presente estudo, quando os proprietários levaram seus animais para a consulta as neoplasias já estavam em estágio de desenvolvimento avançado, sendo que elas se encontravam ulceradas e apresentavam grandes dimensões. Alguns estudos sugerem que o tempo de evolução prolongado possibilita a progressão de tumores benignos para malignos (SORENMO et al., 2009). Portanto o atraso no diagnóstico pode limitar severamente as opções terapêuticas em muitos casos e, em última análise, o sucesso do tratamento.

No que concerne o sexo e idade, todos animais do presente estudo eram adultos do sexo feminino, com idade média de $10,3 \pm 3,3$ anos. Nossos achados estão em concordância com a literatura, onde a maioria das neoplasias mamárias em cães é maligna apresentando alta incidência em fêmeas de meia idade a idosas quando comparadas às neoplasias de outros sistemas (MISDORP et al., 1999; MARTINS 2000; RUTTEMAN et al., 2001).

A média de idade descrita para a manifestação de neoplasias mamárias varia entre 10 e 11 anos (RUTTEMAN et al., 2001), porém médias mais baixas (entre 7,3 e 9,5 anos) já foram relatadas pelos seguintes autores (YAMAGAMI et al., 1996; MORRIS et al., 1998; EGENVALL et al., 2005; SORENMO et al., 2009).

No tocante ao perfil racial, 71 % dos animais avaliados no presente estudo eram sem raça definida. Este achado difere dos resultados encontrados por Brodey, Goldschimite e Rozel (1983) que relataram que 70 % dos animais com neoplasias mamárias eram de raças puras. A discussão da prevalência das raças mais acometidas neste estudo fica limitada, pois não se conhece a população canina total da área de coleta de dados.

Em relação à localização anatômica das neofomações na cadeia mamária, 43% estavam localizadas na mama inguinal e mama abdominal cranial. Aproximadamente 60% das cadelas têm neoplasias em mais de uma mama se concentrando principalmente nas mamas abdominais e inguinais, possivelmente por serem as mamas que contem maior quantidade de parênquima, com maior atividade proliferativa (BENJAMINEN;LEE;SAUNDERS., 1999).

O presente estudo observou que as formações localizadas no quadrante caudal representada pela na mama inguinal e mama abdominal cranial foram que apresentaram maior tamanho $2,7 \pm 3,6$ cm e $2,6 \pm 6,3$ cm respectivamente. Além de apresentar um parênquima mais desenvolvido, outra explicação plausível que justifique a maior ocorrência de neoplasias nestas mamas é a maior abundância de receptores hormonais, favorecendo assim a ocorrência de neoplasias (DONNAY et al., 1995). Estudos retrospectivos em âmbito nacional, mostra que as neoplasias com mais de 5 cm são mais prevalentes em nosso contexto (OLIVEIRA et al., 2003). Este fato reflete muitas vezes a demora que os animais são levados para consulta ao médico veterinário.

Em relação ao tamanho Hashimoto et al. (2002) e Itoh et al. (2005) mostraram que as neofomações mamárias apresentaram dimensões menores quando comparados aos achados nacionais (OLIVEIRA et al., 2003), apresentando tamanho médio de 3 cm em 77,6% e 80,6% dos casos. Acredita-se que isso se deve, em parte, ao contato mais próximo de cães com os proprietários, possibilitando a detecção mais precoce de nódulos mamários.

As principais alterações encontradas referentes aos exames laboratoriais foram inespecíficas, condizentes com doenças de evolução crônica e não específicas de neoplasia. Anemia, trombocitopenia, leucocitose e aumento das aminotransferases hepáticas foram as principais alterações encontradas.

Anemia e trombocitopenia foram secundárias à evolução e cronicidade da doença devido a focos hemorrágicos decorrentes de ulcerações das mamas. A leucocitose observada esteve associada ao quadro de bacteremia secundária à ulceração e necrose do parênquima tumoral. Os achados referentes ao aumento das enzimas fosfatase alcalina e ALT podem estar relacionadas com quadro de hipoxemia crônica decorrente ao quadro de anemia ou hepatopatias subclínicas não diagnosticadas como infiltração gordurosa.

Como não há estudos na medicina veterinária descrevendo e avaliando a expressão imuno-histoquímica de IDO nas neoplasias mamárias caninas, buscou-se uma análise comparativa entre os resultados obtidos pelo presente estudo com trabalhos realizados com pacientes humanos portadores de neoplasias mamárias.

Todas as amostras avaliadas apresentaram imunomarcção positiva para o anticorpo anti-IDO e a intensidade de marcação variou de fraca a forte. Em relação à distribuição, todos os casos apresentaram marcação citoplasmática confinada, principalmente nas células epiteliais localizadas nos ductos mamários, porém em 42% dos casos, foi observada imunomarcção nas células inflamatórias que compõem o estroma tumoral. A localização antigênica e a distribuição da marcação encontrada foram similares aos resultados encontrados em outros estudos envolvendo neoplasias mamárias humanas (SAKURAI, 2005; JUHÁSZ et al., 2012; SOLIMAN et al., 2013).

Considerando que as imunomarcções encontradas foram validadas através do teste *Western blot* associado aos controles positivos e negativos, assume-se que as marcações encontradas foram específicas. Segundo Soliman et al.(2013) receptores hormonais HER2, estrógeno e progesterona encontrados nas células neoplásicas também apresentam imunomarcção para IDO.

Em relação a intensidade marcação o critério de avaliação utilizado para classificação do escore de imunomarcção foi baseado no estudo realizado por Soliman et al. (2013). A imuno-histoquímica é uma técnica semi quantitativa e subjetiva, já que é observador dependente e baseado em escore padronizado de intensidade de coloração.

Como se trata de uma avaliação semi-quantitativa, os achados encontrados no presente estudo mostraram uma tendência, onde as células atípicas apresentaram baixo escore de marcação variando de 0 a 1 enquanto as áreas histológicas com morfologia celular

característica, variando de bem a moderadamente diferenciadas apresentaram escores de marcação superiores variando de 1 a 3.

Tal achado aventa uma hipótese, como a IDO é uma enzima intracelular presente em diversos tipos celulares e principalmente em algumas neoplasias, esta enzima pode desempenhar um papel importante na fase inicial do desenvolvimento tumoral quando os mecanismos imunomoduladores são uma das principais vias responsáveis pelo início da carcinogênese. Nesta fase inicial as células ainda preservam suas características citológicas habituais e portanto, podem apresentar concentrações citoplasmáticas elevadas de IDO justificando aumento de sua expressão.

A medida que a célula perde suas características morfológicas e polaridade habitual decorrente da progressão tumoral pode haver uma diminuição desta enzima no compartimento intracelular e conseqüentemente diminuição da expressão. Quando a célula alterada atinge este estágio, ela já perdeu sua autorregulação e seus mecanismos antitumorais, nesta fase outros mecanismos reguladores de desenvolvimento e invasão tumoral podem torna-se mais patentes e a IDO pode não mais desempenhar um papel importante na progressão tumoral. Outro achado peculiar restrito as células atípicas, foi a presença de pequenos grânulos intracitoplasmáticos. Esta tendência não foi observada em estudos humanos.

Em relação aos dados referentes ao escore de imunomarcção na literatura humana, os resultados apresentam achados conflitantes no que diz respeito ao grau de diferenciação tecidual e a expressão de IDO (GODIN et al.; 2009; JACQUEMIER et al.; 2011; JUHÁSZ et al., 2012; SOLIMAN et al., 2013).

Segundo Godin et al. (2009) a expressão de IDO em pacientes com câncer de mama foi muito superior quando comparado a pacientes que apresentavam lesões benignas

Em contrapartida Jacquemier et al. (2010) e Soliman et al. (2013) observaram que a expressão de IDO foi maior em amostras de mamas que não tinham lesões de origem neoplásicas quando comparadas amostras contendo lesões neoplásicas e que sua expressão não se correlacionou com a classificação histológica, grau de diferenciação tecidual, tamanho do tumor, invasão linfática e infiltração ganglionar

O estudo apresentado por Juhász et al. (2012) relata que pacientes que exibiam forte ou moderada expressão de IDO correlacionavam-se com neoplasias agressivas, com alto grau de malignidade em estágio avançado da doença e pior prognóstico. Estes achados diferem dos resultados encontrados pelo presente estudo em relação ao grau de malignidade, pois quanto melhor a diferenciação tecidual maior foi a intensidade de imunomarcção, já os tecidos pouco diferenciados apresentaram escore de marcação inferior. O presente estudo não avaliou

possíveis correlações entre expressão de IDO e a taxa de sobrevivência e prognóstico, pois para aquisição desta informação seria necessário um longo período de acompanhamento para monitorar estas variáveis.

O presente estudo avaliou a intensidade de marcação por meio de uma análise semi-quantitativa cujo material utilizado foi oriundo de tecidos parafinizado. Os resultados divergentes relacionados a intensidade de marcação e prognóstico em estudos humanos podem estar relacionados com a metodologia de análise. A expressão da IDO envolve mecanismos complexos tais como a transcrição e tradução do RNA, portanto estudos biomoleculares que avaliam a expressão de IDO pela mensuração de RNA mensageiro e quantificação de proteínas apresentam maior sensibilidade e conseqüentemente podem apresentar maior expressão da proteína IDO quando comparado a análise de tecido arquivados e parafinizados.

Atualmente, na medicina veterinária procura-se novas estratégias e alvos terapêuticos para a modulação da resposta antitumoral em pequenos animais. Como a IDO é expressa por diversas células do organismo além de estar presente em alguns tipos tumorais, como as neoplasias mamárias caninas esta enzima representa um alvo terapêutico potencial para uma abordagem complementar no tratamento oncológico.

3.6. CONCLUSÃO

1. Os cães acometidos por neoplasia mamária em nosso meio são em sua maioria fêmeas, adultas com idade média de 13 anos, sem raça definida, reproduzindo o perfil epidemiológico em outros centros de investigação.
2. O Carcinoma simples foi o tipo histológico mais prevalente, medindo $2,7 \pm 3,6$ cm localizado principalmente na mama inguinal e abdominal cranial.
3. Neoplasias mamárias caninas expressam a enzima indoleamina 2,3 dioxigenase.
4. À distribuição da imunomarcação, esteve confinada principalmente às células localizadas nos ductos mamários e apresentaram marcação citoplasmática. Houve diferença na intensidade de marcação entre células bem diferenciadas e células atípicas.

REFERÊNCIAS

- BENJAMIN S. A.; LEE, A. C.; SAUNDERS, W. J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 423-436, 1990.
- BRODEY, R. S.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ROSZEL, J. R. Canine mammary gland neoplasms. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 19, p. 61-90, 1983.
- CHUN, R.; GARRET, L. Urogenital and mammary gland tumors. In ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and cat**. St Louis: Elsevier Saunders, 2005, v. 1, p.784-784.
- DALECK, C. R.; FRANCESCHINI, P. H.; ALESSI, A. C.; SANTANA, A. E.; MARTINS, M. I. M. Aspectos clínicos e cirúrgicos do tumor mamário canino. **Ciência Rural**, v. 28, n. 1, p. 95-100, 1998.
- DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHERI, S. M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C. H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamento em cães, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 2, p.15-26, 2002.
- DONNAY, I.; RAUIS, J.; DEVLEESHIUWER, N.; WOUTERS-BALLMAN, P.; LECLERCQ, G.; VERSTEGEN, J. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 9, p. 1188-1194, 1995.
- EGENVALL, A.; BONNETT, N. B.; ÖHAGEN, P.; OLSON, P.; HEDHAMMAR, A.; VON EULER, H. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 69, p. 109-127, 2005.
- GODIN-ETHIER, J.; PELLETIER, S.; HANAFI, L. A.; GANNON, P. O. FORGET, M. A.; ROUTY, J. P. Human activated T lymphocytes modulate IDO expression in tumors through Th1/Th2 balance. **Journal Immunology**, v. 183, p. 7752-7760, 2009.
- GOLDSCHMIDT, M.; PENA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, p. 117-131, 2011.
- HASHIMOTO, S.; YAMAMURA, H.; SATO, T.; KANAYAMA, K.; SAKAI, T. Prevalence of mammary gland tumor of small breed dog in the Tokyo metropolitan area. **Journal Veterinary Epidemiology**, n. 6, v. 2, p. 85-91, 2002.
- HAYASHI, A.; OHONISHI, H.; OKAZAWA, H.; NAKAZAWA, S.; IKEDA, H.; MOTEGI, S.; AOKI, N.; KIMURA, S.; MIKUNI, M.; MATOZAKI. Positive regulation of phagocytosis by SIRP beta and its signaling mechanism in macrophages. **Journal Biological Chemistry**, v. 279, p. 29450-24460, 2004.
- HSU, S. M.; RAINE, L. The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. **Journal Histochemistry and Citochemistry**, v. 29, p. 577-580, 1981.

IOTH, T.; UCHIDA, K.; ISHIKAWA, K. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, p. 345-347, 2005.

JACQUEMIER, J.; BERTUCCI, F.; FINETTI, P.; ESTERNI, B.; CHARAFE-JAUFFRET, E.; THIBULT, M.L.; HOUVENAEGHEL, G.; VAN DEN EYNDE, B.; BIRNBAUM, D.; OLIVE D, XERRI, L. High expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in the tumour is associated with medullary features and favourable outcome in basal-like breast carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 130, n. 1, p. 96-104, 2011.

JUHÁSZ, H.; NAHLEH, Z.; ZITRON, I.; CHUGANI, D.C.; JANABI, M.; BANDYOPADHYAY, M.; ALI-FEHMI, F.; MANGNER, T.; CHAKRABORTY, P.K.; MITTAL, M.; MUZIK, O. Tryptophan metabolism in breast cancers: molecular imaging and immunohistochemistry studies. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 39, n. 7, p. 926 - 932, 2012.

KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T.C.; DESSIRIS, A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: Application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 246-252, 2005.

MARIA, P. P.; SOBRAL, R. A.; DALECK, C. R. Casuística de cães portadores de neoplasias, atendidos no hospital veterinário da UNESP-Jaboticabal durante o período de 01.01.95 a 01.05.97. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 3. 1998, Belo Horizonte. **Anais...** Santa Maria: Colégio Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, 1998. p. 61.

MARTINS, A. M. C. R. P. F. **Estudo retrospectivo-sistemático e de proteínas fibrilares da matriz extra-celular de neoplasias mamárias benignas e malignas na espécie canina.** 2000.117 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2000.

MARTINS, A. M. C. R. P. F.; TAMASO, E.; GUERRA, J. L. Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 39, n. 1, p.38-42, 2002.

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HÉLIMEN, E.; LIPSCOMB, T. B. Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. In: HEAD, K. W.; CULLEN, J. M.; DUBIELZIG, R. R.; ELSE, R. W.; MISDORP, W.; PATNAIK, A. K.; TATEYAMA, S.; VAN DER GAAG, I. (Eds.) **Histological classification of tumors and domestic animals.** 2. ed. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; World Health Organization, 1999. p. 18-21.

MORRIS, J. S.; DOBSON, J. M.; BOSTOCK, D. E.; O'FARRELL, E. Effect of ovariectomy in bitches with mammary neoplasms. **Veterinary Record**, v.142, p. 656-658, 1998.

MULLER, A. J.; DUHADAWAY, J. B.; DONOVER, P. S.; SUTANTO-WARD, E.; PRENDERGAST, G. C. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. **Nature Medicine**, v. 11, p. 312-318, 2005.

MUNN D. H., ZHOU, M.; ATTWOOD, J. T.; BONDAREV, I.; CONWAY, S.J.; MARSHALL, B.; BROWN, C.; MELLOR, A. L. Prevention of allogenic fetal rejection by tryptophan catabolism. **Science**, v. 21, p. 1191-1193, 1998.

MUNN, D. H.; SHARMA, M. D.; HOU, D.; BABAN, B.; LEE, J. R. ; ANTONIA, S. J.; MESSINA, J. L.; CHANDLER, P.; KONI, P. A.; MELLOR, A. L. Expression of IDO by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, p. 280–290, 2004.

OCHSENBEIN, A. F. Immunological ignorance of solid tumors. **Springer Seminars Immunopathology**, v. 27, p. 19–35, 2005.

OLIVEIRA, L. O.; OLIVEIRA, R. T.; LORETTI, A. P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 2, p. 105-110, 2003.

RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. Tumors of the mammary gland. In: MACEWEN, G. E, WITHROW, S. J. **Small animal clinical oncology**. 3 ed. Philadelphia: Saunders Company, 2001. p. 455-477.

SAKURAI, K.; AMANO, S.; ENOMOTO, K.; KASHIO, M.; SAITO, Y.; SAKAMOTO, A. Study of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in patients with breast cancer. **Gan To Kagaku Ryoho Cancer Chemotherapy**, v. 32, p. 1546–1549, 2005.

SOLIMAN, H.; RAWAL,B.; FULP,H.; LEE, J. H.; LOPEZ, H.;•BUI, M. M.; KHALIL, F.;ANTONIA, S.; YFANTIS, H.; LEE, D. H.; DORSEY, T. H. Analysis of indoleamine 2-3 dioxygenase (IDO1) expression in breast cancer tissue by immunohistochemistry. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 62, n. 5, p. 829-837, 2013

SORENMO, K. U.; KRISTIENSEN, V. M.; COFONE, M. A.; SHOFER, F. S.; BREEN A. M.; LANGELAND, M.; MONGIL, C. M.; GRONDAHL, A. M.; TEIGE, J.; GOLDSCHMIDT, M. H. Canine mammary gland tumors; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Veterinary Comparative Oncology**, v. 7, n. 3, p. 162-172, 2009.

TORREZINI, T.; ATHANAZIO, D. A. Cancer immunosurveillance and immunoediting: clinical implications and therapeutic potential. **Revista Brasileira de Cancerologia**; v. 54, n. 1, p. 63-77, 2008.

YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, K.; SUGIYAMA, M. Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumors. **Journal of Small Animal Practice**, v. 37, p. 462-464, 1996.

ZUCCARI D. A. P. C, SANTANA A. E, ROCHA N. S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnostico de tumores mamários de cadelas. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 38, p. 38-41, 2001.

4. Capítulo II

EXPRESSÃO E SUPRESSÃO IN VITRO DA INDOLEAMINA 2,3 DIOXIGENASE DE PELO 1-METIL-DL-TRIPTOFANO EM CÉLULAS DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CÃES.

RESUMO

A indoleamina- 2,3 – dioxigenase (IDO) é uma enzima expressa por diversas células do organismo e, dentre suas muitas funções, atua principalmente na regulação do sistema imune. A presença e ativação de IDO em alguns tipos tumorais representam um dos mecanismos pelo qual as células tumorais podem se evadir do sistema imune, facilitando a indução, crescimento e progressão tumoral. O 1-metil-DL-triptofano é um análogo competitivo do aminoácido triptofano, cuja função é inibir a atividade da IDO bloqueando seu efeito imunossupressor. O objetivo deste trabalho foi avaliar em oito casos de carcinoma simples a expressão e comportamento de IDO, pela técnica de citometria de fluxo, o número de células neoplásicas e inflamatórias que expressam IDO em cultivo celular na presença de fatores como seu substrato L- triptofano e seu inibidor competitivo 1-metil-DL-triptofano (IMT). Os resultados in vitro indicam que, após 24 horas, o grupo suplementado com L - triptofano apresentou aumento significativo da expressão de IDO nas células de carcinoma simples ($49,5 \pm 2,5$) ($p \leq 0,01$), enquanto o grupo tratado 1 metil –DL- triptofano exibiu uma diminuição significativa na expressão de IDO ($33,8 \pm 4,0$) ($p \leq 0,01$). Os macrófagos e células dendríticas na área tumoral também expressaram IDO e foram susceptíveis ao efeito de IMT. O 1 MT é um composto, capaz de inibir a atividade da IDO bloqueando seu efeito imunossupressor. A utilização deste composto representaria um candidato potencial para uma abordagem complementar no tratamento de neoplasias mamárias em pequenos animais.

Palavras-chave: Cães. Neoplasia mamária. IDO. Citometria de fluxo.

EXPRESSION AND IN VITRO SUPPRESSION OF INDOLEAMINE-2, 3-DIOXYGENASE BY 1-METHYL-DL-TRYPTOPHAN IN MAMMARY TUMOUR CELLS FROM DOGS

ABSTRACT

The indoleamine-2, 3 - dioxygenase (IDO) is an enzyme expressed on many cells and among its functions acts mainly on the regulation of the immune system. The presence and activation of IDO in some tumor types represents a mechanism by which tumor cells can evade the immune system, thus facilitating the induction and progression of tumor growth. 1-Methyl-DL-Tryptophan is a competitive analog amino acid of tryptophan that inhibits the activity of IDO by blocking its immunosuppressive effect. Our aim was to evaluate eight animals with simple carcinoma tumors and to verify, by flow cytometry, whether these cells express IDO, and to quantify its in vitro expression on neoplastic cells under influence of IDO substrate tryptophan and IDO competitive inhibitor 1-methyl-DL-tryptophan. Results indicate that, after 24 hours, the group supplemented with L - tryptophan showed significant increased expression of IDO in carcinoma cells (49.5 ± 2.5) ($p \leq 0.05$), while the 1MT treated group displayed a significant decreased on IDO expression (33.8 ± 4.0) ($p \leq 0.05$). Macrophages and dendritic cells at the tumour site also expressed IDO and were susceptible to the effect of 1MT. 1 MT is a compound capable of inhibiting the activity of IDO blocking its immunosuppressive effect. The use of this compound would represent an additional potential approach to the treatment of mammary tumors in small animal candidate.

Keywords: Dogs.. Mammary neoplasia. IDO. Flow Cytometry

4.1 INTRODUÇÃO

É amplamente reconhecido que o câncer de mama é a principal neoplasia que acomete fêmeas da espécie canina, apresentando alta morbidade e mortalidade. A indoleamina- 2,3 – dioxigenase (IDO) é uma enzima expressa por diversas células do organismo e dentre suas muitas funções ela atua principalmente na regulação do sistema imune e na tolerância materna ao feto alogênico. Esta enzima atua inibindo a proliferação de linfócitos T, através do catabolismo do aminoácido triptofano e pela produção de metabolitos que são gerados a partir desta reação, os derivados da quinurenina. Além de inibir a proliferação, os derivados da quinurenina induzem apoptose em linfócitos T. Estudos em seres humanos e camundongos mostraram que a IDO pode ser utilizado pelas neoplasias mamárias, endometrial, ovariana e intestinal como um mecanismo de evasão ao sistema imune facilitando a indução, crescimento e progressão tumoral, uma vez que o sistema imunológico apresenta um importante papel na resposta imune inata contra os tumores através da ativação de células dendríticas e pela apresentação de antígenos tumorais às células T em órgãos linfáticos secundários como os linfonodos.

O 1-metil-DL-triptofano é um análogo competitivo do aminoácido triptofano, cuja função é inibir a atividade da IDO bloqueando seu efeito imunossupressor. Este composto restaura a proliferação de células T aumentando as respostas desta célula contra os antígenos tumorais, (GROHMANN., 2001, HWU et al., 2000; MELLOR et al., 2003). Estudos apontam que a utilização de 1-metil-DL-triptofano em associação com agentes quimioterápicos em neoplasias mamárias em camundongos mostrou que houve considerável redução do crescimento tumoral (MULLER et al. 2005). O 1-metil-DL-triptofano diminui consideravelmente a velocidade de crescimento celular “*in vitro*” para o carcinoma de pulmão em modelo experimental murino. (FRIBERG et al., 2002; UYTENHOVE et al., 2003; MULLER et al, 2005). Devido a relevância deste tema, e a carência de registros na imunoterapia veterinária, bem como a utilização deste composto no tratamento do câncer em pequenos animais, o presente trabalho busca através do cultivo celular do carcinoma mamário e posterior análise pela técnica de citometria de fluxo, quantificar o número de células neoplásicas e células inflamatórias que expressam IDO além de observar seu comportamento na presença dos fatores L- triptofano e 1-metil-DL-triptofano

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo deste estudo foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, protocolo n° 2530/2012.

4.2.1 Casuística

Imediatamente após a realização da mastectomia foram coletadas amostras do tumor tanto para cultura de tecidos para posterior análise na citometria de fluxo como para conservação em formol 10% tamponado para posterior avaliação histopatológica. Foram selecionados oito casos de neoplasias mamárias malignas cujo diagnóstico histopatológico foi carcinoma simples. Todos os proprietários foram esclarecidos quanto aos procedimentos adotados para a realização desta pesquisa e autorizaram formalmente a utilização do material biológico colhido a partir de seus animais.

4.2.2. Cultura celular

Após a mastectomia as amostras destinadas a cultura foram lavadas três vezes em solução salina 0,9% e acondicionadas em meio de cultura D-MEM Low Glicose (Sigma, USA) com antibióticos (Marca Sigma, Lot 1108201 composto por Penicilina 10.000 UI, Estreptomicina 10 mg/ml, e o fungicida anfotericina B, 25 µg/ml).

No laboratório, sob atmosfera estéril o manejo das amostras foi realizado em capela de fluxo laminar (Veco, Biosafe plus Classe II Tipo B3). Inicialmente o material a fresco foi dissecado retirando todo o tecido gorduroso e hemorrágico e seccionado em pequenos fragmentos de 0,01 cm² com o auxílio de um cabo e lâmina de bisturi n° 23 e uma tesoura Metzembal. Posteriormente as amostras foram maceradas mecanicamente, embebidas em meio de cultura D-MEM Low Glicose em placas de Petri e submetidos a técnica de cultivo celular denominada “explante”. Em seguida, a garrafa foi levada à estufa sob atmosfera

contendo CO₂ 95% a temperatura de 37° C durante 6 horas ou até quando os fragmentos se fixaram no fundo da garrafa de cultura 25 cm². Após este período, foi adicionado meio de cultura suficiente para recobrir os fragmentos, incubando-os por 48 a 72 horas em estufa.

Após a confluência das células as mesmas foram submetidas à dissociação química com tripsina-EDTA a 0,25% (Invitrogen) As imagens das células em cultura foram avaliadas diariamente em microscópio de luz invertida (Nikon Eclipse-TS 100), nos aumentos de 40x, 100x e 400x e armazenadas através de sistema de captura (MTC Digital Color Camera).

4.2.3. Determinação da Concentração e viabilidade celular e confecção dos grupos de tratamento.

Após a separação celular, a concentração e viabilidade das amostras foram determinadas através do método de exclusão do azul de Trypan (Sigma, USA) conforme descrito por (FRESHNEY, 2000). A concentração celular foi determinada pela fórmula abaixo:

$$\frac{\text{Número total de células contadas} \times \text{fator de diluição} \times 10^4}{\text{Número de quadrantes contados}}$$

Fonte: (LEANDRO R.M, 2014)

Para a quantificação das células viáveis, foi determinada pela seguinte fórmula a relação entre a quantidade de células vivas (não coradas) e as quantidades totais de células, descartando as suspensões celulares com viabilidade inferior a 30 %.

$$\% \text{ Células Viáveis} = \frac{\text{Número de células viáveis}}{\text{Número de células viáveis} + \text{Número de células mortas}} \times 100$$

Fonte: (LEANDRO R.M, 2014)

Após a caracterização da concentração e viabilidade, uma concentração mínima de 1×10^6 células foi colocada em placas de cultura contendo 48 wells contendo 250 μ l de meio de cultura D-MEM Low Glicose e cultivada durante três dias consecutivos.

Após este período as células foram divididas em três grupos de tratamento, sendo avaliadas através da citometria de fluxo com 24 horas após início do tratamento.

Tratamento – 1. Controle: As células foram mantidas em cultivo com meio D-MEM Low Glicose (Sigma-Aldrich, USA) sem a adição de qualquer fator.

Tratamento – 2. L - Triptofano - diluição (10M HCL - 10mg/ml): As células foram mantidas em cultivo com meio D-MEM low glicose e adicionadas de L-triptofano (Sigma-Aldrich, USA) (diluição final na cultura 0,01mg/250 μ l) (MUNN et al., 2004).

Tratamento – 3: 1-Metil-DL-Triptofano + L -Triptofano: As células foram mantidas em cultivo com meio D-MEM glicose e glicose e adicionadas de 1mM de 1- Metil-DL-Triptofano (Sigma, USA) e de L-Triptofano (Sigma, USA) diluições finais na cultura de 0,001mg/250 μ l e 0,01mg/250 μ l, respectivamente (BOASO et al., 2005).

4.2.4.Citometria de fluxo

A porcentagem de células neoplásicas, células dendríticas e macrófagos que expressam IDO nos diferentes grupos de tratamento foi mensurada pela citometria de fluxo em oito casos de carcinoma simples Para a realização da citometria de fluxo as células neoplásicas foram submetidas a cinco passagens, a fim de garantir uma população de células suficientemente diferenciadas. Nos dias pré-estabelecidos para a análise, as células foram tripsinizadas das placas de cultura e centrifugadas a 1600 x G por 5 minutos a 20⁰C.

Depois de eliminado sobrenadante o pellet de células foi ressuspenso em PBS com a concentração de 1×10^6 células/ ml. As células foram permeabilizadas com Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA) (0,1%) por 30 minutos.

Logo após a permeabilização as células foram lavadas sendo incubadas 0,5 µl do anticorpo primário por 30 minutos. Após este período, as células foram novamente lavadas com PBS 0,1 M e incubadas 0,5µl de anticorpo secundário. A relação dos anticorpos primários utilizados bem como seus respectivos anticorpos secundários, códigos, diluição e dados do fabricante estão dispostos no quadro 2.

Ac. Primário	Código	Diluição	Fabricante	Ac. Secundário	Código	Diluição	Fabricante
Anti-IDO	EB06950	1:500	Everest Biotech, USA	Donkey anti-mouse IGg-FITC	sc2024	1:100	Santa CruzUSA
Macrófagos							
CD11B	MCA275B	1:100	AbD Serotec, USA	Donkey anti-goat IGg -PE	sc3743	1:100	Santa CruzUSA
Dendriticas							
CD11C	MCA1778S	1:100	AbD Serotec, USA	Donkey anti-goat IGg-PE	sc3743	1:100	Santa CruzUSA

Fonte: (LEANDRO R.M, 2014)

Quadro 2 - Lista de anticorpos primários, secundários, diluição, código e dados do fabricante.

O citômetro de fluxo (BD FACScalibur) foi calibrado utilizando células não marcadas. As células serão separadas pelo “forward scatter” para eliminar os debris. A viabilidade celular foi avaliada utilizando o corante violeta que mostra as células viáveis e iodeto de propídio (20 µg/ml), que marca células mortas com perda da integridade da membrana. Os controles para autofluorescência e marcação cruzada pelo anticorpo secundário foram realizados com grupos contendo somente células neoplásicas sem marcação pelo anticorpo primário

Para eliminar uma possível autofluorescência, os parâmetros foram ajustados de maneira a remover qualquer contribuição das células não marcadas. Para cada amostra serão contados no mínimo 10 000 eventos.

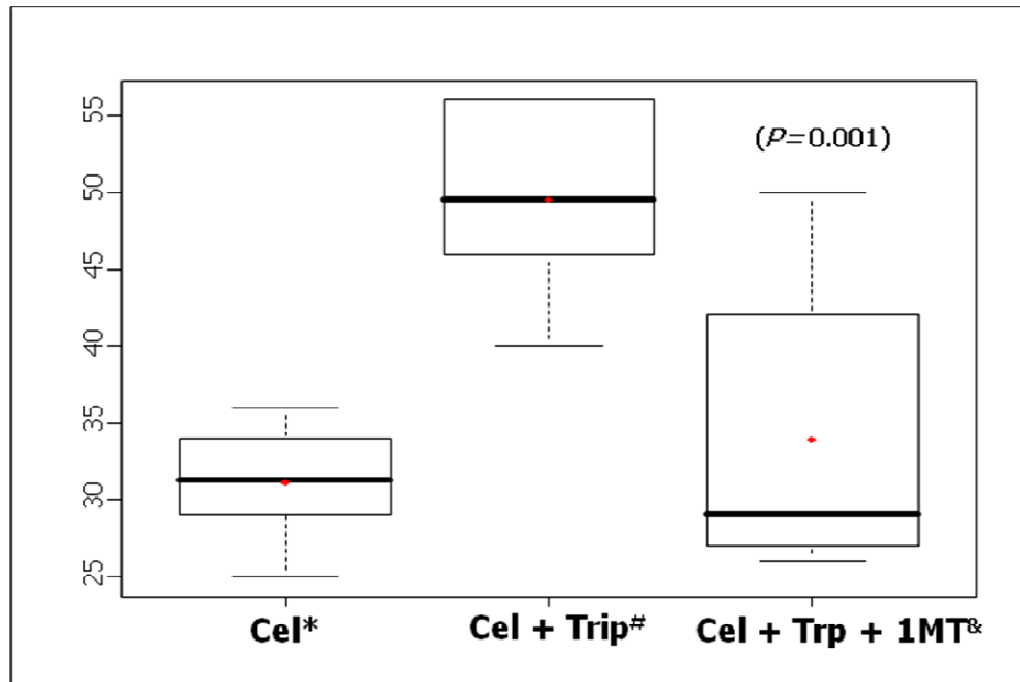
4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparar os resultados entre os grupos usou-se análise variância (ANOVA) e comparações múltiplas de Tukey com intervalos de confiança de 95% para discriminar as diferenças entre os grupos. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados quantitativamente pelo programa Mini Tab 14.

4.4. RESULTADOS

Pelos testes de comparações múltiplas de Tukey e análises de variância buscou-se observar a expressão de IDO nos diferentes grupos de tratamento no período de 24 horas. As células analisadas foram obtidas através do cultivo de oito casos de carcinoma simples. A figura 16 mostra o Density plot e histograma referente ao controle da fluorescência do anticorpo secundário e a viabilidade celular. A viabilidade celular da população analisada pelo violeta foi de aproximadamente de 50%.

A figura 14 mostra que o grupo 2 que recebeu suplementação com L-triptofano foi o grupo que apresentou maiores níveis de expressão de IDO quando comparado ao grupo controle e ao grupo 3 que foi suplementado com 1-metil -DL - triptofano no período de 24 horas. A figura 17 ilustra os histogramas obtidos referente a expressão de IDO na célula neoplásica. Pelos testes de comparações múltiplas de Tukey e análises de variância o resultado encontrado apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,01$) no nível do intervalo de confiança 95%.

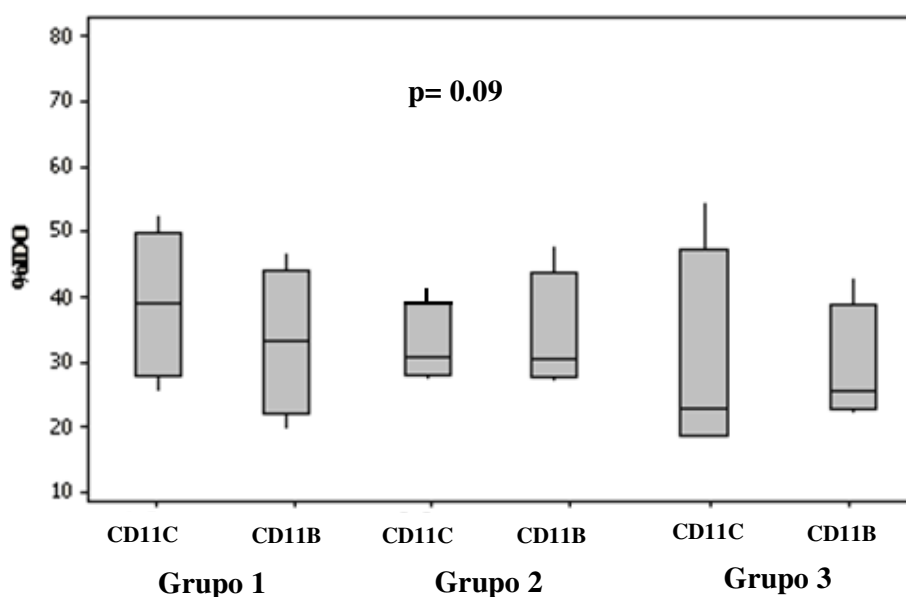


Fonte: (LEANDRO R.M, 2014)

*célula, # célula+ triptofano, & célula + triptofano + & célula + triptofano +1-Metil-DL-Triptofano

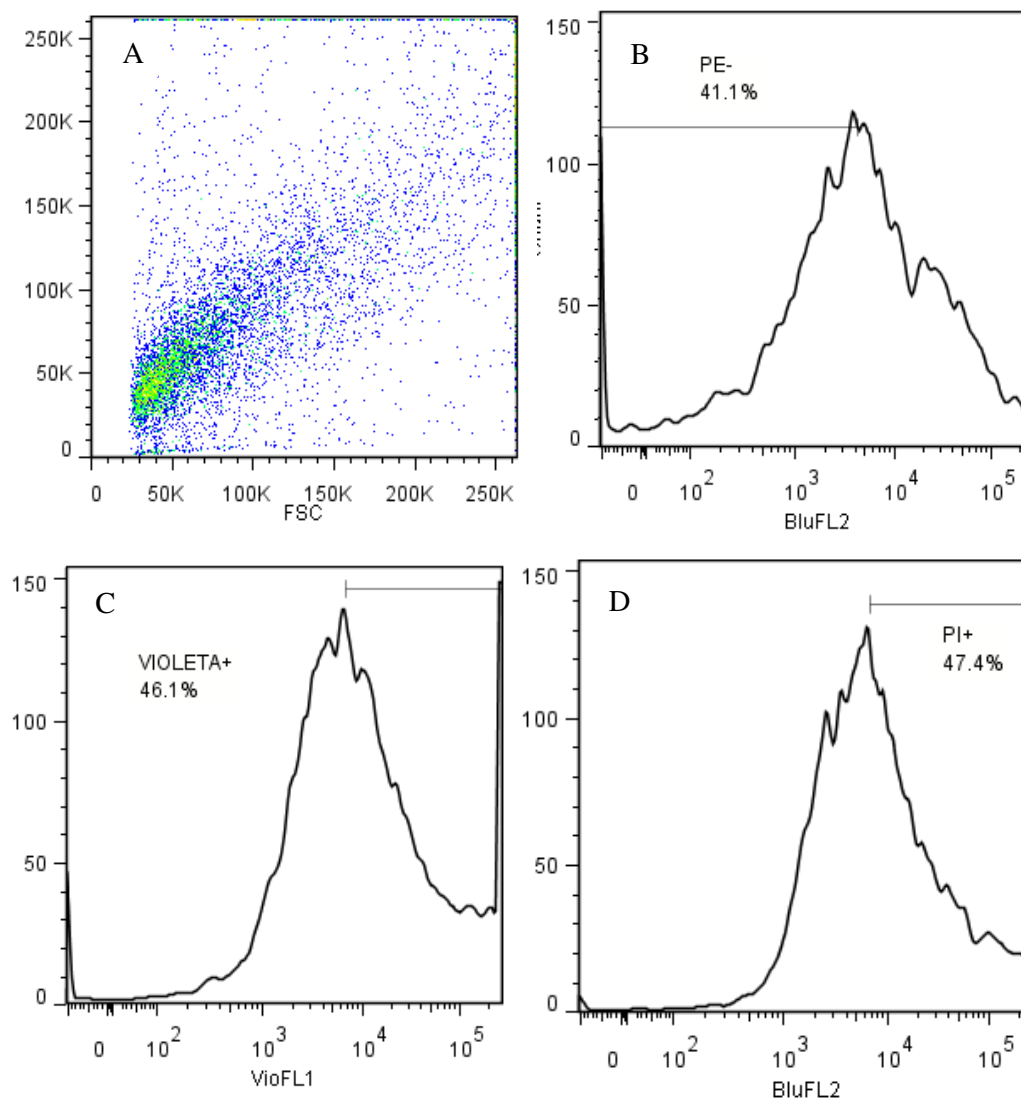
Figura 14 - Comparação da expressão de IDO entre os diferentes grupos de tratamento após 24 horas. O grupo 2 (L- Triptofano) apresentou níveis superiores de expressão de IDO quando comparado ao grupo 1 (Controle) ($P\text{-value} = 0,001$) e ao grupo 3 (1 metil DL triptofano) ($P\text{-value} = 0,001$). Não houve diferenças estatisticamente significativas ($P\text{-value} = 1,000$) entre os grupos 1 e 3. Caixa interna representa porcentagem, linha interna representa mediana, barras de erros os valores mínimos e máximos, asteriscos representam valores extremos.

As figuras 18 e 19 mostram que as células dendríticas e macrófagos residentes no estroma tumoral apresentaram imunomarcção positiva para IDO. A figura 15 mostra que não houve diferença estatisticamente significativa da expressão de IDO tanto nas células dendríticas (CD11C +) bem como nos macrófagos (CD11B +) entre os grupos tratamento ($p=0,09$); entretanto o grupo 3, que foi suplementado com 1-metil-DL-triptofano, mostrou uma discreta diminuição da expressão de IDO em ambos tipos celulares



Fonte: (LEANDRO R.M, 2014)

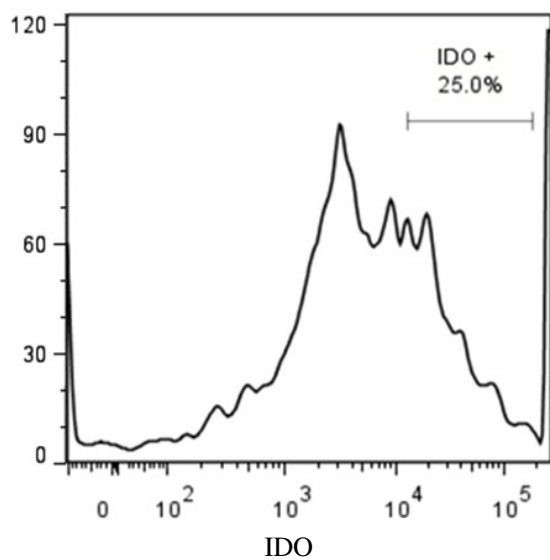
Figura 15 - Comparação da expressão de IDO nas células dendríticas (CD11C) e macrófagos (CD11B) frente aos diferentes grupos de tratamento após 24 horas. Caixa interna representa porcentagem, linha interna representa mediana, barras de erros os valores mínimos e máximos.



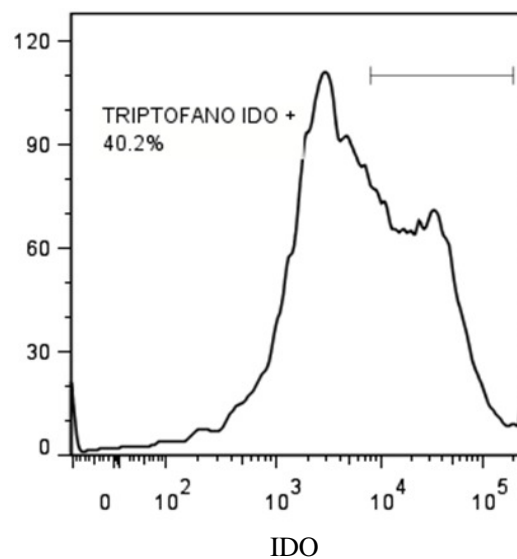
Fonte: (LEANDRO R.M, 2014)

Figura 16 – *Density plot e histogramas controles*. **A.** O *density plot* em azul representa as populações celulares encontradas. **B Histograma. Fluorescência** - anticorpo secundário (Donkey anti-goat IGg -PE). **C. Histograma violeta** – viabilidade celular, porcentagem células vivas. **D. Histograma Iodeto de propídio** – viabilidade celular, porcentagem de células mortas.

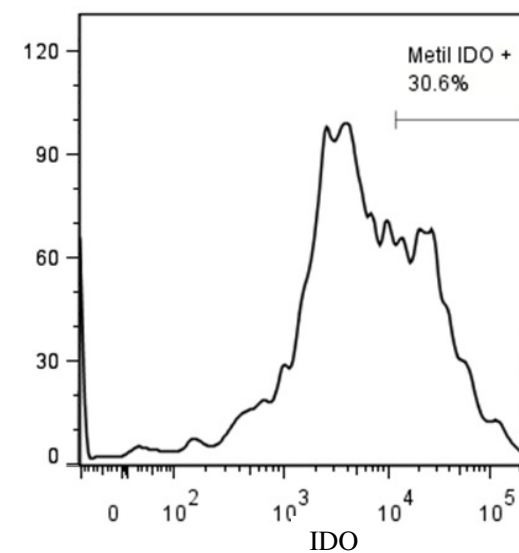
A. Grupo 1 - Células



B. Grupo 2 - L-Triptofano

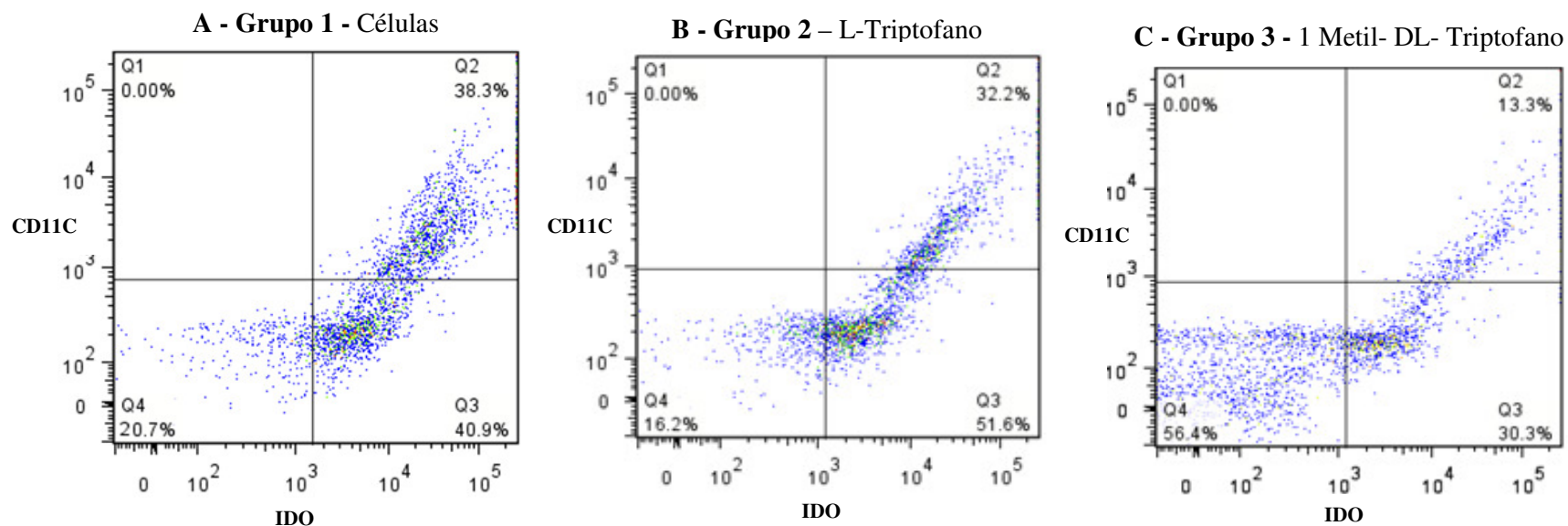


C. Grupo 3 - 1 Metil DL Triptofano



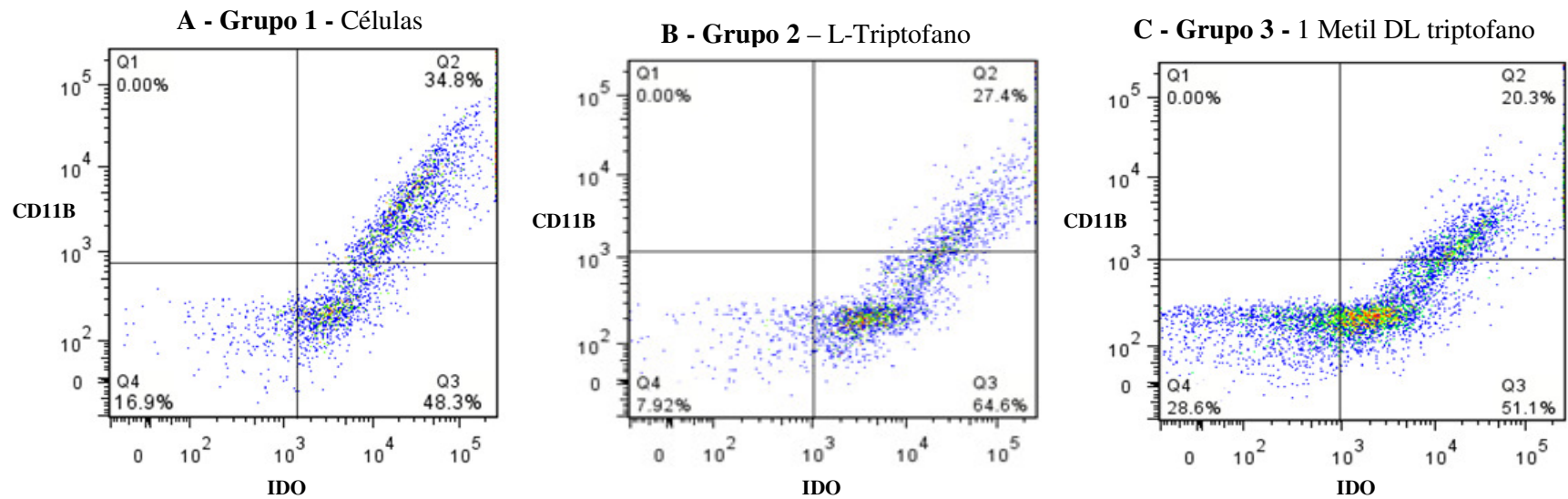
Fonte: (LEANDRO R.M, 2014)

Figura 17-**A. Histograma Grupo 1 (controle)** - porcentagem de células que expressam IDO sem suplementação. **B. Histograma Grupo 2**- Porcentagem de células que expressam IDO quando suplementadas com L-triptofano. **C. Histograma Grupo 3** Porcentagem de células que expressam IDO quando suplementadas com L-triptofano e 1 metil- DL-triptofano.



Fonte: (LEANDRO R.M, 2014)

Figura 18– **Density plot** com quadrantes - **Q1**. Marcação positiva para anticorpo CD11C; **Q2**. Dupla marcação positiva para anticorpo CD11C e IDO; **Q3** Marcação positiva para anticorpo IDO, **Q4** Dupla Marcação negativa. **A. Density plot Grupo 1 (controle)** porcentagem de células que expressão IDO sem suplementação. **B. Density plot Grupo 2-** Porcentagem de células que expressa IDO quando suplementadas com L-triptofano. **C. Density plot Grupo 3 -** Porcentagem de células que expressa IDO quando suplementadas com L-triptofano e 1 metil- DL- triptofano.



Fonte: (LEANDRO R.M, 2014)

Figura 19 – *Density plot* com quadrantes - **Q1**. Marcação positiva para anticorpo CD11B; **Q2**. Dupla marcação positiva para anticorpo CD11B e IDO; **Q3** Marcação positiva para anticorpo IDO, **Q4**. Dupla Marcação negativa. **A. *Density plot* Grupo 1 (controle)** porcentagem de células que expressam IDO sem suplementação. **B. *Density plot* Grupo 2-** Porcentagem de células que expressam IDO quando suplementadas com L-triptofano. **C. *Density plot* Grupo 3 -** Porcentagem de células que expressam IDO quando suplementadas com triptofano e 1 metil- DL-triptofano.

4.5. DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou que a expressão *in vitro* de IDO em tumor mamário de cão foi sensível à ação do 1-metil-DL-triptofano.

Para a realização da citometria de fluxo as células neoplásicas foram submetidas a cinco passagens, a fim de garantir uma população de células suficientemente diferenciadas. A viabilidade celular encontrada foi de 50%.

Muitas linhagens celulares em culturas primárias podem ser propagadas sem perder suas características celulares por até oito passagens (ALVES; GUIMARÃES, 2010). Entretanto a medida que a cultura é repicada, as células com maior capacidade de proliferação como as células neoplásicas irão predominar na garrafa de cultivo em detrimento das células que não se adaptam bem ao cultivo ou que, devido a traumas do processo de passagem perdem sua capacidade de proliferação e morrem prejudicando a viabilidade a medida que aumenta o número de passagens. Esta sequencia de eventos pode justificar o percentual de células viáveis no presente trabalho.

O comportamento *in vitro* de IDO foi primeiramente observado nas neoplasias mamárias frente a suplementação com triptofano. Os resultados encontrados em relação à expressão de IDO pelas células neoplásicas em cultura mostraram que o grupo que recebeu suplementação com L- triptofano apresentou aumento da expressão da enzima IDO. Como a IDO é uma enzima responsáveis pelo catabolismo desse aminoácido, a suplementação com o mesmo no meio de cultura resultou no aumento da expressão desta enzima. Além do triptofano a IDO pode ser induzida por INF- γ , lipopolissacarídeo, IL-2, IL4, IL-6, IL10 (TATSUMI; ATHANAZIO, 2000).

O grupo de células neoplásicas que recebeu suplementação com 1-metil-DL-triptofano apresentou diminuição acentuada dos níveis desta enzima. Este ensaio permitiu avaliar a verdadeira potencialidade deste composto como um importante inibidor da atividade de IDO.

O 1-metil-DL-triptofano é um análogo competitivo do aminoácido triptofano, cuja função é inibir a atividade da IDO pela da substituição do átomo de nitrogênio de sua cadeia aromática indol, impedindo a degradação do triptofano, bloqueando a clivagem oxidativa do anel pirrólico.

Estudos apontam que a utilização de 1 Metil-DL-triptofano diminui consideravelmente a velocidade de crescimento celular “*in vitro*” para o carcinoma de pulmão em modelo

experimental murino. (FRIBERG et al., 2002; MULLER et al., 2005). Foi descrito também que a utilização de 1 Metil-DL-triptofano em tumor mamário espontâneo proveniente de um modelo murino retardou o crescimento tumoral quando utilizado com quimioterápicos, não sendo observado o mesmo resultado quando o 1 Metil-DL-triptofano foi utilizado sozinho (MULLER et al., 2005).

Com bloqueio daIDO mediante a utilização do composto 1 Metil-DL-triptofano há restauração da proliferação de células T aumentando as respostas desta célula contra os antígenos tumorais inibindo o catabolismo do triptofano além de promover o aumento de células Th1 e uma diminuição de células Th2 e células T reguladoras (MELLOR, MUNN, 2001; UYTENHOVE et al., 2003; MULLER et al., 2005; POTULA et al., 2005; HOU et al.; 2007; LOB et al.; 2008; LOB et al.; 2009).

No presente estudo também foi observado que macrófagos e células dendríticas, residentes no estroma tumoral, apresentaram imunomarcagem positiva paraIDO. Além de ser expressa pelos próprios tumores, aIDO pode ser encontrada em diferentes tipos celulares particularmente as células apresentadoras de antígenos como as células dendríticas e os macrófagos (JOHNSON; MUNN, 2012). Acredita-se que estas células sejam recrutadas para áreas adjacentes a neoplasia ou se fixem no próprio estroma com intuito de contribuir com os mecanismos de evasão e desenvolvimento tumoral (JOHNSON; MUNN, 2012).

Segundo o estudo postulado por Godin et al. (2009) existe uma crescente evidência que a presença de macrófagos nas neoplasias mamárias auxilia a progressão e proliferação de células tumorais e aumentam risco de ocorrência metástases. Estes macrófagos associados a tumores são classificados como macrófagos tróficos, e apresentam importantes funções imunorreguladoras que suprimem as respostas imunitárias citotóxicas especialmente a ação das células T, B e Natural Killer por meio da ação citotóxica dos metabólitos criados a partir do catabolismo do triptofano. (KRNETA; GILLGRASS; ASHKAR, 2013).

Estes achados sugerem que a expressão deIDO pelas células apresentadoras de antígenos seria um mecanismo capaz de regular ativação de células T por meio do catabolismo de triptofano no microambiente em que encontram.

Não houve aumento da expressão deIDO nas células dendríticas bem como nos macrófagos no grupo suplementado com triptofano. Em relação ao grupo que foi tratado com 1-metil-DL-triptofano houve uma discreta diminuição da expressão deIDO em ambos tipos celulares. Apesar de não haver correlação estatística a expressão deIDO foi ligeiramente inferior no grupo tratado com 1 metil- DL-triptofano reforçando os resultados encontrados

pelo autor Duluc et al. (2007) que descreve o 1 metil- DL-triptofano um inibidor efetivo da expressão de IDO em macrófagos e células dendríticas revertendo anergia das células T.

A imunoterapia é uma modalidade terapêutica promissora para o tratamento do câncer, e pode ser uma ferramenta para modular a resposta antitumoral. Um fármaco que bloqueie a ação da IDO como o composto o 1 metil- DL-triptofano pode ser útil para reversão da imunossupressão induzida pelos tumores sendo um candidato potencial para modulação de IDO e pode ser utilizada no futuro como tratamento complementar para o controle do carcinoma mamário em cães.

Com a realização de estudos multicêntricos poderemos inferir mais sobre a potencialidade do uso desta substância fornecendo subsídios para pesquisas futuras na área de imunoterapia veterinária sobre a participação da IDO na carcinogênese e criação de novas estratégias terapêuticas que possam efetivamente superar a evolução e desenvolvimento das neoplasias mamarias em cães.

4.6. CONCLUSÃO

1. A expressão in vitro de IDO em células de carcinoma mamário apresentou aumento significativo de sua expressão quando suplementado com o substrato L-triptofano, ao passo que o composto 1 metil- DL-triptofano proporcionou uma importante diminuição na expressão de IDO. Este resultado caracteriza que o 1 metil- DL-triptofano é um candidato potencial para modulação IDO atuando como uma abordagem terapêutica complementar para o tratamento de carcinoma da mama em cães.
2. Células apresentadoras de antígeno como macrófagos e células dendríticas residentes no tecido tumoral expressam IDO in vitro e sofrem influencia do composto 1 metil-DL-triptofano.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, A. M.; CRAWFORD, M.; BETERA, S.; RUDERT, W.; TAKIKAWA, O.; ROBBINS, P. D.; TRUCCO, M. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted NOD islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocys. **Diabetes**, v. 51, p. 356-365, 2002.
- ALLEGRA, M.; FURTMULLER, P. G.; REGELSBRGER, G.; TURCO-LIVERI, M. L.; TESORIERE, L.; PERRETTI, M.; LIVREA, M. A.; OBINGER, C. Mechanism of reaction of melatonin with human myeloperoxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 2, p. 380-386, 2000.
- ALVES, E A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. In. MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, 2010, v. 2, cap. 5, p.215-251.
- ASKESAY, N.; KAMINITZ, A.; YARKONI, S. Mechanisms of T regulatory cell function Autoimmun. **Autoimmunity Reviews**, v. 7, n. 5, p. 370-375, 2008.
- BARTSCH, C.; BARTSCH, H.; KARASEK, M. Melatonin in clinical oncology. **Neuroendocrinology Letters**, v. 23, p. 30-36, 2002.
- BAUER, T. M.; JIGA, L. P.; CHUANG, J. J.; RANDAZZO, M.; OPELZ, G.; TEMESS, P. Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptohan metabolites suppress rt allogenic T-cell responses in vitro and in vivo. **Transplant Immunology**, v. 18, p. 95-100, 2005.
- BEATY, W. L.; BYRNE, G. I.; MORRISON, R. P. Morphologic and antigenic characterization of interferony mediated persistent Chlamydia trachomatis infection in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 3998-4002, 1993.
- BENJAMIN S.A.; LEE, A C.; SAUNDERS, W. J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 423-436, 1990.
- BOASSO, A.; HERBEUVAL, J. P.; HARDY, A. W.; WINKLER, C.; SHEARER, G. M. Regulation of indoleamina 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4⁺ T cells. **Blood**, v. 105, p. 1574-1581, 2005.
- BOASSO, A.; SHEARER, G. M. How does indoleamine 2,3 dioxygenase contribute to HIV mediated immune dysregulation. **Current Drug Metabolism**, v. 8, n. 3, p. 217-223, 2007.
- BORISH, L. il-10: evolving concepts. **Journal of Allergy Clinical Immunology International**, v. 101, p. 293-297, 1998.
- BOSTOCK, D. Neoplasia of the skin and mammary glands in dogs and cats. In: KIRK, R. W. **Current veterinary therapy: small animal practice**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1977. v. 6, p. 493-496.

BURNET, FM. Concept of immunological surveillance. **Progress in Experimental Tumor Research**, v. 13, p. 27, 1970.

BRODEY, R. S.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ROSZEL, J. R. Canine mammary gland neoplasms. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 19, p. 61-90, 1983.

CASSALI G. D. Patologia da glândula mamária. In: NASCIMENTO E.F. ; SANTOS R.L. (Eds). **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 119-133.

CHEN, W. J. IDO: more than an enzyme. **Nature Immunology**, n. 12, v. 9, p. 809–811, 2011.

CHUN, R.; GARRET, L. Urogenital and mammary gland tumors. In ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and cat**. St Louis: Elsevier Saunders, 2005, v. 1, p.784-784.

DAÍ, X, ZHU, B. T. Indoleamine 2,3 dioxygenase tissue distribution and cellular localization in mice implications for its biological functions. **Journal Histochemistry and Cytochemistry**, v. 58, n. 1, p. 17-28, 2010.

DALECK, C. R.; FRANCESCHINI, P. H.; ALESSI, A. C.; SANTANA, A. E.; MARTINS, M. I. M. Aspectos clínicos e cirúrgicos do tumor mamário canino. **Ciência Rural**, v. 28, n. 1, p. 95-100, 1998.

DELLE, H. **Indução da expressão da molécula indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) como terapia gênica em transplante experimental de ilhotas pancreáticas**. 2007.113 f. Tese (Doutorado em Ciência)- Faculdade de Medicina, Universidade de são Paulo, 2007.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHERI, S. M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C. H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamento em cães, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 2, p. 15-26, 2002.

DEL-PRETE, G.; DE-CARLI, M.; ALMERIGOGNA, F.. GIUDIZI, M.G.; BIAGIOTTI, R.; ROMAGNANI, S. Human IL-10 is produce by both type 1 helper (th1) and type 2(th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. **Journal of Immunology**, v. 15, p. 353-360, 1993.

DONNAY, I.; RAUIS, J.; DEVLEESHIUWER, N.; WOUTERS-BALLMAN, P.; LECLERCQ, G.; VERSTEGEN, J. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. **American Journal Veterinary Research**,v. 56,n. 9, p. 1188-1194, 1995.

DUNN, G. P. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumors escape. **Nature Immunology**, v. 3, p. 991-998, 2002.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The three Es of cancer immunoediting. **Annual Reviews Immunology**, v. 22, p.329-360, 2004.

DULUC, D.; DELNESTE, Y, TAN, F.; MOLES, M.; GRIMAUD, L.; LENOIR, J. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte: differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. **Blood**, v. 110, n. 3, p. 4319-4330, 2007.

ENGEL, A. M.; SVANE, I. M.; MOURITSEN, S.; RYGAARD, J.; CLAUSEN, J.; WERDELIN, O. Methylcholanthrene-induced sarcomas in nude mice have short induction times and relatively low levels of surface MHC class I expression. **Actas Pathological, Microbiological et Immunologica Scandinavica**, v. 104, n. 9, p. 629-639, 1996.

EGENVALL, A.; BONNETT, N. B.; ÖHAGEN, P.; OLSON, P.; HEDHAMMAR, A.; VON EULER, H. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 69, p.109-127, 2005.

FALLARINO, F.; GROHMANN, U.; YOUS, S.; MACGRATH, B. C.; CAVENER, D. R.; VACCA, C.; ORABONA, C.; BIANCHI, R.; BELLADONNA, M. L.; VOLPI, C.; SANTAMARIA, P.; FIORETTI, M. C.; PUC CETTI, P. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites downregulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in native T cells. **Journal of Immunology**, v. 176, p. 6752-6761, 2006.

FALLARINO, F.; GROHMANN, U.; VACCA, C.; BIANCHI, R.; ORABONA, C.; SPRECA, A.; FIORETTI, M. C.; PUC CETTI, P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. **Cell Death and Differentiation**, v. 9, p.1069-1077, 2002.

FERGUNSON, H. R. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 15, n.3, p. 501-511, 1985.

FILDLER, I. J.; ADT, D. A.; BRODEY, R. S. Biological behavior of canine mammary neoplasms. **Journal of Veterinary Medical Association**, v. 151, n. 10, p. 1311-1318, 1967.

FRESHNEY, R. I. Tissue culture; Cell culture; Laboratory manuals. In: FRESHNEY, R. I. **Culture of Human Mammary Epithelial Cells**. 4 Ed, J. Wiley (New York). P.95, 2000.

FRIBERG, M.; JENNINGS, R.; ALSARRAJ, M.; DESSUREEAULT, S.; CANTOR, A.; EXTERMANN, M.; MELLOR, A. L.; MUNN, D.H.; ANTONIA, S. J. Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T-cell mediated rejection, **International Journal of Cancer**, v. 101, p.151-155, 2002.

FRISCH, M.; BIGGAR, R. J.; ENGELS, E.A.; GOEDERT, J.J. Association of cancer with AIDS-related immunosuppression in adults. **The Journal of the American Medical Association**. v. 285, n.13, p.1736-745, 2001.

GAJEWSKI, T. F.; MENG, Y.; HARLIN, H. Immune suppression in the tumor microenvironment. **Journal of Immunotherapy**, v. 29, p. 223-240, 2006.

GABOOR, L. J.; JACKSON, M. L.; TRASK, B. Feline leukemia virus status of Australian cats with lymphosarcoma. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, n. 7, p. 476-481, 2001.

GODIN-ETHIER, J.; PELLETIER, S.; HANAFI, L. A.; GANNON, P. O. FORGET, M.A.; ROUTHY, J. P. Human activated T lymphocytes modulate IDO expression in tumors through Th1/Th2 balance. **Journal Immunology**, v.183, p. 7752-7760, 2009.

- GOLDSCHMIDT, M.; PENA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, p. 117-131, 2011.
- GRIFFEY, S.M.; MADEWEL, B. R.; DAIRKEE, S. H.; HUNT, J. E.; NAYDAN, D. K.; HIGGINS, R. J. Immunohistochemical reactivity of basal and luminal epithelium specific cytokeratin antibodies within normal and neoplastic canine mammary glands. **Veterinary Pathology**, v. 30, p. 155-161, 1993.
- GROHMANN, U.; FALLARINO, F.; SILLA, S. CD40 ligation ablates the tolerogenic potential of lymphoid dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 1, p. 277-283, 2001.
- GRUTZ, G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, p. 3-15, 2005.
- HAYASHI, A.; OHONISHI, H.; OKAZAWA, H.; NAKAZAWA, S.; IKEDA, H.; MOTEGI, S.; AOKI, N.; KIMURA, S.; MIKUNI, M.; MATOZAKI. Positive regulation of phagocytosis by SIRP beta and its signaling mechanism in macrophages. **Journal Biological Chemistry**, v. 279, p. 29450-24460, 2004.
- HASHIMOTO, S.; YAMAMURA, H.; SATO, T.; KANAYAMA, K.; SAKAI, T.. Prevalence of mammary gland tumor of small breed dog in the Tokyo metropolitan area. **Journal Veterinary Epidemiology**, v. 2, n. 6, p. 85-91, 2002.
- HOU, D.-Y.; MULLER, A. J.; SHARMA, M. D.; DUHADAWAY, J.; BANERJEE, T.; JOHNSON, M.; MUNN, D. H. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. **Cancer Research**, v. 6, 7n.2, p.792–801, 2007.
- HSU, S. M.; RAINE, L. The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. **Journal Histochemistry and Citochemistry**, v. 29, p. 577-580, 1981.
- HWU, P.; DU, M. X.; LAPOINTE, R.; DO, M.; TAYLOR, M. W.; YOUNG, H. A. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T-cell proliferation. **Journal of Immunology**, v. 164, p. 3596–3599, 2000.
- IOTH, T.; UCHIDA, K.; ISHIKAWA, K. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, p. 345-347, 2005.
- JACQUEMIER, J.; BERTUCCI, F.; FINETTI, P.; ESTERNI, B.; CHARAFE-JAUFFRET, E.; THIBULT, M.L.; HOUVENAEGHEL, G.; VAN DEN EYNDE, B.; BIRNBAUM, D.; OLIVE D, XERRI, L. High expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in the tumour is associated with medullary features and favourable outcome in basal-like breast carcinoma, **International Journal of Cancer**, v. 130, n. 1, p. 96-104, 2011.
- JIA, L.; TIAN, P.; DING, C. Immunoregulatory effects of indoleamine 2,3 dioxygenase in transplantation. **Transplant Immunology**, v. 21, p. 18-22, 2009.
- JOHNSON, T. H.; MUNN, D. H. Host indoleamine 2,3-dioxygenase: contribution to systemic acquired tumor tolerance. **Immunological Investigations**, v. 41, p.765-797, 2012.

JUHÁSZ, H.; NAHLEH, Z.; ZITRON, I.; CHUGANI, D. C.; JANABI, M.; BANDYOPADHYAY, M.; ALI-FEHMI, F.; MANGNER, T.; CHAKRABORTY, P. K.; MITTAL, M.; MUZIK, O. Tryptophan metabolism in breast cancers: molecular imaging and immunohistochemistry studies. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 39, n. 7, p. 926 - 932, 2012.

KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T. C.; DESSIRIS, A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: Application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 246-252, 2005.

KATZ, J. B.; MULLER, A. J.; PRENDERGAST, G. C. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. **Immunological Reviews**, v. 222, p. 206-221, 2008.

KIM, R.; EMI, K.; TANABE, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. **Immunology**, v. 121, n. 1, p. 1-14, 2007.

KRNETA, T.; GILLGRASS, A.; ASHKAR, A.A. The influence of macrophages and the tumor microenvironment on natural killer cells. **Current Molecular Medicine**, v. 13, n. 1, p. 68-79, 2013.

LARSSON, M.; HAGBERG, L.; NORKRANS, G.; FORSMAN, A. Indoleamine deficiency in blood and cerebrospinal fluid from patients with human immunodeficiency virus infection. **Journal of Neuroscience Research**, v. 23, p. 441-446, 1989.

LISSONI, P.; ROVELLI, F.; MALUGANI, F.; BUCOVEC, R.; CONTI, A.; MAESTRONI, G. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. **Neuroendocrinology Letters**, v. 22, p. 45-47, 2001.

LÖB, S.; KÖNIGSRAINER, A.; RAMMENSEE, H.-G.; OPELZ, G.; TERNESS, P. Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees? **Nature Reviews Cancer**, v.6, n.9, p. 445-452, 2009.

LÖB, S.; KONIGSRAINER, A.; SCHAFER, R.; RAMMENSEE, H.-G.; OPELZ, G.; TERNESS, P. Levo- but not dextro-1-methyl tryptophan abrogates the IDO activity of human dendritic cells. **Blood**, v. 111, n. 4, p. 2152-2144, 2008.

LYON, D. E.; WALTER, J. M.; STARKWEATHER, A. R.; SCHUBERT, C. M.; MCCAIN, N. L. Tryptophan degradation in women with breast cancer: a pilot study. **Biomed Central Research Notes**, v. 4, p. 151-156, 2011.

MACKENZIE, C. R.; HADDING, U.; DAUBENER, W. Interferon- γ -induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B Streptococci. **Journal of Infectious Diseases**, v. 178, p. 875-878, 1998.

MACLACHALAN, N. J.; KENNEDY, P. C. Tumors of the genital systems, p.547-573. In: Meuten D.J. (Ed.), **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Ames: Iowa State Press, 2002

MARIA, P. P.; SOBRAL, R. A.; DALECK, C. R. Casuística de cães portadores de neoplasias, atendidos no hospital veterinário da UNESP-Jaboticabal durante o período de 01.01.95 a 01.05.97. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 3., 1998, Belo Horizonte. **Anais...** Santa Maria: Colégio Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, 1998. p.61.

MARTINS, A. M. C. R. P. F. **Estudo retrospectivo-sistemático e de proteínas fibrilares da matriz extra-celular de neoplasias mamárias benignas e malignas na espécie canina.** 2000.117 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2000.

MARTINS, A. M. C. R. P. F.; TAMASO, E.; GUERRA, J. L. Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 1, p. 38-42, 2002.

MEDAWAR, P.D. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. SYMPOSIUM OF THE SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, 7., 1953. **Anais...**[S.l: s.n.], 1953. p. 320-328.

MELLOR, A. L.; BABAN, B.; CHANDLER, P.; MARSHALL, B.; JHAVER, K.; HANSEN, A.; KONI, P. A.; IWASHIMA, M.; MUNN, D. H. Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. **Journal of Immunology**, v. 171, p. 1652- 1655, 2003.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Tryptophan catabolism prevents maternal T cells from activating lethal antifetal immune responses. **Journal of Reproductive Immunology**, v.52, p. 5-13, 2001.

MELLOR, A.; MUNN, D. IDO Expression by dendritic cells: tolerance and catabolism. **Nature Reviews**, v. 4, p. 762-772, 2004.

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HÉLIMEN, E.; LIPSCOMB, T. B. Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. In: HEAD, K. W.; CULLEN, J. M.; DUBIELZIG, R. R.; ELSE, R. W.; MISDORP, W.; PATNAIK, A. K.; TATEYAMA, S.; VAN DER GAAG, I. (Eds.) **Histological classification of tumors and domestic animals.** 2. ed. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; World Health Organization, 1999. p. 18-21.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: Meuten D. J. (Ed.), **Tumors in domestic animals.** 4. ed. Ames: Iowa State Press, 2002, p. 575-606.

MITCHELL, L.; IGLESIA, F.A.; WENKOFF, M. S.; VAN DREUMEL, A. A.; LUMB, G. Mammary tumors in dogs: survey of clinical and pathological characteristics. **Canadian Veterinary Journal**, v. 15, n. 5, p. 131 - 138, 1974.

MOFFETT, J. R.; NAMBOODIRI, M. A. Tryptophan and the immune response. **Immunology Cell Biology**, v. 3, p. 247-265, 2003.

MOORE, K.W.; DE WALL-MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin -10 receptor. **Annual Review Immunology**, v. 19, p. 683-765, 2001.

- MORRIS, J. S.; DOBSON, J. M.; BOSTOCK, D. E.; O'FARRELL, E. Effect of ovariectomy in bitches with mammary neoplasms. **Veterinary Record**, v. 142, p. 656-658, 1998.
- MOULTON, J.E. Tumor of the mammary gland. In: MOULTON, J.E. **Tumors in domestic animals**. 3. ed. Berkeley: University of California Press, 1990. p. 518-549.
- MULLER, A. J.; DUHADAWAY, J. B.; DONOVER, P. S.; SUTANTO-WARD, E.; PRENDERGAST, G. C. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. **Nature Medicine**, v. 11, p. 312-318, 2005.
- MULLEY, W. R.; NIKOLIC-PATERSON, D. J. Indoleamine 2,3 dioxygenase in transplantation. **Nephrology**, v. 13, p. 204-221, 2008.
- MULLIGAN, R. M. Mammary cancer in the dog: a study of 120 cases. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 9, p. 1391-1396, 1975
- MUNN DH., ZHOU, M.; ATTWOOD, J. T.; BONDAREV, I.; CONWAY, S. J.; MARSHALL, B.; BROWN, C.; MELLOR, A. L. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. **Science**, v. 21, p. 1191-1193, 1998.
- MUNN, D. H.; SHARMA, M. D.; HOU, D.; BABAN, B.; LEE, J. R.; ANTONIA, S. J.; MESSINA, J. L.; CHANDLER, P.; KONI, P. A.; MELLOR, A. L. Expression of IDO by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, p. 280-290, 2004.
- MUNN, D. H., MELLOR, A. L. Indoleamine 2, 3 - dioxygenase and tumor induced tolerance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 1147-54, 2007.
- OCHSENBEIN, A. F. Immunological ignorance of solid tumors. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 27, p.19-35, 2005.
- OLIVEIRA, L. O.; OLIVEIRA, R. T.; LORETTI, A. P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 2, p. 105-110, 2003.
- PAGES, F.; BERGER, A.; CAMUS, M.; SANCHEZ-CABO, F.; COSTES, A.; MOLIDO, R. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 25, p. 2654-666, 2005.
- PALLOTTA, M. T.; ORABONA, C.; VOLPI, C.; VACCA, C.; BELLADONNA, M. L.; BIANCHI, R.; GROHMANN, U. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. **Nature Immunology**, v. 12, n. 9, p. 870-878, 2011.
- PELETEIRO M C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 89, n. 509, p. 10-29, 1994.
- PEREIRA, K.S.; ZUCCARI, D.A.P.C.; CURY, P.M.; CORDEIRO, J.A. Apoptosis as a prognostic marker in canine tumors by TUNEL. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 359-365, 2003.

PÉREZ-ALENZA, M.D.; PENA, L.; DEL CASTILHO, N.; NIETO, A.L. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumors. **Journal of small Animal Practice**, v. 41, p. 287-291, 2000.

PFEFFERKORN, E.R. Interferon γ blocks the growth of toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, p. 908, 1984.

POTULA, R.; POLUEKTOVA, L.; KNIPE, B.; CHRASTIL, J.; HEILMAN, D.; DOU, H.; TAKIKAWA, O.; MUNN, D. H.; GENDELMAN, H. E.; PERSIDSKY, Y. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) enhances elimination of virus-infected macrophages in animal model of HIV-1 encephalitis. **Blood**, v. 106, p. 2382-2388, 2005.

PRIESTER, W.A.; MONTEL, N. Occurrence of tumors in domestic animals: data from 12 United States and Canadian colleges of veterinary medicine. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 47, n. 6, p.1333-1344, 1971.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 97, n. 543, p.119- 120, 2002.

RASKOVALOVA, T.; LOKSHIN, A.; HUANG, X.; SU, Y.; MANDIC, M.; ZAROOUR, H.M.; JACKSON, E. K.; GORELIK, E. Inhibition of cytokine production and cytotoxic activity of human antimelanoma specific CD8+ and CD4+ T lymphocytes by adenosine-protein kinase A type I signaling. **Cancer Research**, v. 67, n. 12, p. 5949–5956, 2007.

RUTELLA, S.; BONANNO, G.; PROCOLI, A.; MARIOTTI, A.; DE RITIS, D.G.; CURTI, A.; DANESE, S.; PESSINA, G.; PANDOLFI, S.; NATONI, F.; DI FEBBO, A.; SCAMBIA, G.; MANFREDINI, R.; SALATI, S.; FERRARI, S.; PIERELLI, L.; LEONE, G.; LEMOLI, R.M. Hepatocyte growth factor favors monocyte differentiation into regulatory interleukin (IL)-10++IL-12low/neg accessory cells with dendritic-cell features. **Blood**, v. 108, p.218-227, 2006.

RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. Tumors of the mammary gland. In: MACEWEN, G.E, WITHROW, S.J **Small Animal Clinical Oncology**. 3 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. p. 455-477.

SANNI, L. A.; THOMAS, S. R.; TATTAM, B. N.; MOORE, D. E.; CHAUDHRI, G.; STOCKER, R.; HUNT, N. H. Dramatic changes in oxidative tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in experimental cerebral and noncerebral malaria. **American Journal of Pathology**, v.152, p. 611, 1998.

SAKURAI, K.; AMANO, S.; ENOMOTO, K.; KASHIO, M.; SAITO, Y.; SAKAMOTO, A. Study of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in patients with breast cancer. **Gan To Kagaku Ryoho Cancer & Chemotherapy**, v. 32, p. 1546–1549, 2005.

SCHNEIDER, R.; DORN, C.R.; TAYLOR, D.O.N. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 43, p. 12249-1261, 1969.

SILVA, N. M.; RODRIGUES, C. V.; SANTORO, M. M.; REIS.; ALVARES-LEITE, J. L.; GAZZINELLI, R. T. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase tryptophan degradation and kynurenine formation during in vivo infection with toxoplasma gondii: induction by endogenous interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 859, 2002.

SOLIMAN, H.; RAWAL,B.; FULP,H.; LEE, J. H.; LOPEZ, H.;•BUI, M. M.; KHALIL, F.;ANTONIA, S.; YFANTIS, H.; LEE, D. H.; DORSEY, T. H. Analysis of indoleamine 2-3 dioxygenase (IDO1) expression in breast cancer tissue by immunohistochemistry. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 62, n. 5, p. 829-837, 2013.

SORENMO, K. U.; KRISTIENSEN, V. M.; COFONE, M. A.; SHOFER, F. S.; BREEN A. M.; LANGELAND, M.; MONGIL, C. M.; GRONDAHL, A. M.; TEIGE, J.; GOLDSCHMIDT, M. H. Canine mammary gland tumors; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Veterinary Comparative Oncology**, v. 7, n. 3, p. 162-172, 2009.

STRATMANN, N.; FAILING, K.; RICHTER, A.; WEHREND, A. Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. **Veterinary Surgery**, v. 37, p. 82-86, 2008.

STUTMAN, O. Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 62, n. 2, p. 353 - 358, 1979.

STEWART, T.; TSAI, S. C.; GRAYSON, H.; HENDERSON, R.; OPELZ, G. Incidence of de-novo breast cancer in women chronically immunosuppressed after organ transplantation. **Lancet**, v. 346, p. 796-98, 1995.

SVANE, I. M.; ENGEL, A. M.;NIELSEN, M. B.; LJUNGGREN, H. G.; RYGAARD, J.;WERDELIN, O.; CHEMICALL, Y. Induced sarcomas from nude mice are more immunogenic than similar sarcomasfrom congenic normal mice. **European Journal of Immunology**, v.26, n.8, p.1844-85, 1996.

TATSUMI, K.; HIGUCHI,T.; FUJIWARA,H.; NAKAYAMA,T.; EGAWA, H.; ITOH,K. Induction of Tryptophan 2,3-Dioxygenase in the mouse endometrium during implantation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 274, p.166-170, 2000.

TORREZINI, T.; ATHANAZIO.; D. A. Cancer immunosurveillance and immunoediting: clinical implications and therapeutic potential. **Revista Brasileira de Cancerologia**; v. 54, n. 1, p. 63-77, 2008.

TRAVERS, M. T.; GOW, I. F.; BARBER, M. C.; THOMSON, J.; SHENNAN, D. B. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and L-tryptophan transport in human breast cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 166, n. 1, p. 106-112, 2004.

TRINCHIERI, G. Regulatory role of T cells producing both interferon gamma and interleukin 10 in persistent infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 194, p. 53-57, 2001.

UYTTENHOVE, C.; PILOTTE, L.; THÉATE, I.; STROOBANT, V.; COLAU, D.; PARMENTIER, N.; BOON, T.; VAN DEN EYNDE, B. J. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by IDO. **Nature Medicine**, v. 9, p. 1269–1274, 2003.

WARBURTON, M. I.; HUGHES, C. M.; FERRS, S. A.; RUDLAND, P. S. Localization of vimentin in myoepithelial cells of the rat mammary gland. **Histochemical Journal**, v. 21, p. 679-685, 1989.

YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, K.; SUGIYAMA, M. Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumors. **Journal of Small Animal Practice**, v. 37, p. 462-464, 1996.

ZOU, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 4, p. 263-74, 2005.

ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, p. 38-41, 2001.

ANEXO 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu _____

Documento de identidade _____ Sexo Masculino () Feminino () Data de Nascimento _____ Endereço _____ Nº _____ Apto _____ Bairro _____ Cidade _____ Cep _____ Telefone(____) _____ Proprietário(a) do animal _____ da Raça _____, Espécie _____, Sexo _____, Idade _____ inscrito no registro interno do Hospital Veterinário da Universidade de Santo Amaro (Nº __) declaro ter sido esclarecido pelo responsável da pesquisa o Médico Veterinário Rafael Magdanelo Leandro, CRMV-SP 18.684 sobre a utilização de fragmentos de neoplasia mamária, provenientes do meu animal, em experimento a ser realizado nas dependências do Laboratório de Técnicas Imunológicas Aplicadas a Morfofisiologia (LITAM) no departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para o estudo Expressão da enzima Indoleamina-2,3-dioxigenase em neoplasias mamárias de cães. Concordo voluntariamente que meu animal participe deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante a realização da pesquisa, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que meu animal ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do Proprietário _____ São Paulo __ de _____ de 20__

Assinatura da testemunha _____ São Paulo __ de _____ de 20__

ANEXO 2

Questionário

Nome:		Raça:		Idade:		RI:	
Proprietário:				Cidade:		Telefone:	
Tempo de evolução:							
Já teve outros tumores de mama: Sim () Não ()				Realizou mastectomia: Sim () não ()			
Há quanto tempo foi feita mastectomia:				Quanto tempo demorou a reicidiva:			
Histórico reprodutivo							
Atividade reprodutiva		Não castrada ()		castrada ()		Motivo castração	
				Qual a idade na época da castração ?		<input type="checkbox"/> conveniencia <input type="checkbox"/> piometra <input type="checkbox"/> outro	
Uso de anticoncepcional		não ()		sim ()		Número de aplicações:	
Pseudociese		não ()		sim ()		Número de episódios:	
						medicações sim () Não ()	
Cobertura e gestações		Nulipara ()		Pluripara ()		Número de gestações:	
Informações Gerais							
Alimentação		Ração () Qual?		Comida caseira () Ingredientes		Ração e comida caseira () Ingredientes	
Doença crônica		Sim () Qual?		Não ()		Petiscos () Qual?	
Estado geral		Sim ()		Não ()			
Emagrecimento Progressivo		Sim ()		Não ()			
Uso de algum medicamento		Sim () Qual?		Não ()			
Exame Físico							
Mucosas		Normocoradas()		Congestas ()		Perláceas ()	
Hidratação Normal () Desidratação ()__%						Ictéricas ()	
						Temperatura Retal:	
						Peso:	

Auscultação	FC_____ bpm	FR_____ mmp	Estertores Não() Sim () Tipo	
Auscultação cardíaca	Arritmia ()	sopro () Grau:	Hipofonese ()	Hiperfonese ()
Palpação abdominal	Não ()		Sim () Qual ?	
Avaliação macroscópica das mamas. (Informar T. tamanho cm/ U. ulcerada)				
Cadeia direita	Toracica Cranial	Toracica Caudal	Abdominal cranial	Abdominal caudal Inguinal
Cadeia esquerda	Toracica Cranial	Toracica Caudal	Abdominal cranial	Abdominal caudal Inguinal
Linfonodos	Linfonodo axilar Normal () Aumentado () Qual ?		Linfonodo Inguinal Normal () Aumentado () Qual ?	
metástase pulmonares	Não ()		Sim() alteração	
metástase abdominal	Não ()		Sim() alteração	
Exames	Hemograma ()		Uréia ()	Creatinina () Glicose ()
	FA ()		ALT ()	Albumina () PT ()
	ECG ()		ECO ()	Calcio sérico () Outros ()