PEDRO KASTEIN FARIA DA CUNHA BIANCHI

Influência do estrógeno e progesterona na ativação in vitro da indoleamina 2,3 dioxigenase – IDO – em células presentes no microambiente do carcinoma mamário de cadelas.

São Paulo
2017

PEDRO KASTEIN FARIA DA CUNHA BIANCHI

Influência do estrógeno e progesterona na ativação in vitro da indoleamina 2,3 dioxigenase – IDO – em células presentes no microambiente do carcinoma mamário de cadelas.

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 a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2017

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3576
FMVZ

Bianchi, Pedro Kastein Faria da Cunha

Influência do estrógeno e progesterona na ativação in-vitro da indoleamina 2,3 dioxigenase-IDO- em células presentes no microambiente do carcinoma mamário de cadelas / Pedro Kastein Faria da Cunha Bianchi. -- 2017.
84 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2017.

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. Câncer de mama. 2. Hormônios da reprodução. 3. Imunoevasão. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Influência do estrógeno e progesterona na ativação in vitro da indoleamina 2,3 dioxigenase - IDO - em células presentes no microambiente do carcinoma mamário de cadelas.", protocolada sob o CEUA nº 5055170117, sob a responsabilidade de **José Roberto Kfoury Júnior** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 01/06/2017.

We certify that the proposal "Influence of estrogen and progesterone on the in vitro activation of indoleamine 2,3 dioxigenase - IDO - in cells present in the microenvironment of the mammary carcinoma of female dogs.", utilizing 15 Dogs (15 females), protocol number CEUA 5055170117, under the responsibility of **José Roberto Kfoury Júnior** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 06/01/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **01/2016** a **12/2017**

Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Cães**

sexo: **Fêmeas**

idade: **1 a 8 anos**

N: **15**

Linhagem: **NDA**

Peso: **2 a 30 kg**

Resumo: A enzima indoleamina 2,3 dioxigenase - IDO desempenha um importante papel na regulação do sistema imunológico, impedindo o estabelecimento de uma resposta imunológica no microambiente em que é expressa. Quando ativada, é responsável por catabolizar o aminoácido triptofano, privando células em proliferação deste componente e gerando metabólitos que as induzem a apoptose. Hormônios, como o estrógeno e a progesterona são capazes de alterar as funções imunológicas nas células, podendo levar à alteração na expressão da IDO, contudo, os mecanismos responsáveis por este efeito, ainda não são claros. Sabe-se que diversas células tumorais e leucócitos adjacentes à região do tumor podem expressar IDO e são sensíveis à ação desses hormônios. Os carcinomas mamários são os mais comuns nos cães, tendo grande expressão de IDO. Em face destas informações, este projeto busca investigar a influência do estrógeno e da progesterona na expressão da IDO em cultura de células provenientes do carcinoma mamário de cadelas, buscando identificar possíveis mecanismos envolvidos. Para isso, utilizar-se-ão culturas de células primárias de carcinoma mamário de cadelas que serão tratadas com os referidos hormônios e seus respectivos antagonistas de receptor (tamoxifeno - estrógeno e mifepristone - progesterona). A expressão da enzima será analisada pela citometria de fluxo, quantificada pela técnica de western blot, e o mRNA será mensurado pela técnica de Real Time PCR. Dessa forma, espera-se, além da confirmação da ação desses hormônios, indicativos de possíveis vias envolvidas nesse processo, o que permitiria a modulação da expressão da IDO, favorecendo o desenvolvimento de protocolos terapêuticos em patologias que necessitem da ação de células imunológicas.

Local do experimento: Laboratório de Técnicas Imunológicas Aplicadas a Morfofisiologia LTIAM-FMVZ-USP

São Paulo, 01 de junho de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BIANCHI, Pedro Kastein Faria da Cunha

Título: Influência do estrógeno e progesterona na ativação in vitro da indoleamina 2,3 dioxigenase – IDO – em células presentes no microambiente do carcinoma mamário de cadelas.

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 a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da realização desta pesquisa.

Agradecimentos

Aos meus pais Carlos Alberto Bianchi e Lise Maria Kastein Faria da Cunha Bianchi o meu eterno agradecimento. Sem vocês nada disso seria possível.

A minha irmã, Tatiane Kastein Faria da Cunha Bianchi, por sempre estar ao meu lado me ajudando, a sua presença é essencial em minha vida

A minha pequena sobrinha, Manuela Bianchi por simplesmente me fazer sorrir. Você me fez ver a vida com mais alegria.

Ao meu grande amor, Gabriela Bezerra Pucci, por estar ao meu lado em todos os momentos, me ouvindo, aconselhando e principalmente, compartilhando todas as glórias e dificuldades. Você foi essencial para a conclusão desta jornada.

Aos meus avos paternos e maternos deixo aqui a minha gratidão por sempre participarem da minha vida, mostrando-me as suas melhores faces.

Aos meus colegas de pós-graduação, Renata Silva, Rafael Magdanelo, Flavia Ponce, Tulio Yoshinaga e Aline Poscai. Os momentos com vocês foram especiais.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior, pela sua imensa paciência, dedicação e competência. Muito obrigado por me receber e por me acompanhar durante essa etapa de minha vida.

A todos os professores do programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

A prof. Dra. Paula de Carvalho Papa, pela confiança durante o uso do seu laboratório.

RESUMO

BIACHI, P. K. F. C. Influência do estrógeno e progesterona na ativação in vitro da indoleamina 2,3 dioxigenase – IDO – em células presentes no microambiente do carcinoma mamário de cadelas. [Influence of estrogen and progesterone on the in vitro activation of indoleamine 2,3 dioxigenase - IDO - in mammary carcinoma cells of female dogs]. 2017. 78f f. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A enzima indoleamina 2,3 dioxigenase - IDO desempenha um importante papel na regulação do sistema imunológico, impedindo o estabelecimento de uma resposta imunológica no microambiente em que é expressa. Quando ativada, é responsável por catabolizar o aminoácido triptofano, privando células em proliferação deste componente e gerando metabólitos que as induzem a apoptose. Hormônios, como o estrógeno e a progesterona são capazes de alterar as funções imunológicas nas células, podendo levar à alteração na expressão da IDO, contudo, os mecanismos responsáveis por este efeito, ainda não são claros. Sabe-se que diversas células tumorais e leucócitos adjacentes à região do tumor podem expressar IDO e são sensíveis à ação desses hormônios. Os carcinomas mamários são os mais comuns nos cães, apresentando grande expressão de IDO. Em face destas informações, este trabalho buscou investigar a influência do estrógeno e da progesterona na expressão da IDO em cultura de células provenientes do carcinoma mamário de cadelas tratadas com os referidos hormônios e seus respectivos antagonistas de receptor (tamoxifeno – estrógeno e mifepristone – progesterona). A expressão da enzima foi analisada pela imunohistoquímica, citometria de fluxo e quantificada pela técnica de western blot, enquanto os mRNA foram analisados por Real time-PCR. Os resultados da quantificação da enzima (citometria de fluxo e Western blot) seguiram o mesmo padrão da expressão de mRNA. Perante a suplementação das células com estrógeno, houve a elevação da expressão da enzima e do respectivo mRNA que, após a adição de tamoxifeno, antagonista do receptor do estrógeno, reduziu a referida expressão. A suplementação com progesterona, resultou numa discreta diminuição na expressão da IDO e respectivo mRNA, a qual foi revertida após a adição do inibidor de progesterona (mifepristone). Com estes achados, conclui-se que os hormônios esteroides, devido às modificações nos padrões de citocinas expressas pelas células PR e ER positivas no microambiente tumoral, provocam alterações na expressão de IDO.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer de mama, Hormônios da reprodução, Imunoevasão, Mifepristone, Tamoxifeno.

ABSTRACT

BIACHI, P. K. F. C. **Influence of estrogen and progesterone on the in vitro activation of indoleamine 2,3 dioxygenase - IDO - in mammary carcinoma cells of female dogs.** [Influência do estrógeno e progesterona na ativação in vitro da indoleamina 2,3 dioxigenase – IDO – em células presentes no microambiente do carcinoma mamário de cadelas]. 2017. 78f f. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The indoleamine 2,3 dioxygenase - IDO enzyme plays an important role in the regulation of the immune system, preventing the establishment of an immune response in the microenvironment in which it's expressed. When activated, it's responsible for catabolizing the amino acid tryptophan, depriving cells in proliferation of this component generating metabolites that induce apoptosis. Hormones such as estrogen and progesterone are capable of alter immune functions in cells and may lead to altered expression of IDO, but the mechanisms responsible for this effect are still unclear. It is known that several tumor cells and leucocytes adjacent to the tumor region are able to express IDO and are sensitive to the action of these hormones. Breast carcinomas are the most common in female dogs, presenting a great expression of IDO. Bearing this information, this study aimed to investigate the influence of estrogen and progesterone on the expression of IDO in culture of mammary carcinoma cells from bitches treated with these hormones and their respective receptor antagonists (tamoxifen - estrogen and mifepristone - progesterone). The expression of the enzyme was analyzed by immunohistochemistry, flow cytometry and quantified by the western blot technique, while the mRNA was analyzed by Real-time PCR. The results of enzyme quantification (flow cytometry and Western blot) followed the same pattern of mRNA expression. There was an increase of the enzyme expression and mRNA in the estrogen treated group, in contrast to the decrease observed in the progesterone group. When the cells were subjected to the hormonal inhibitors, an evident decrease of IDO expression percentage and the respective mRNA was verified following the supplementation of tamoxifen and a restoration of IDO expression values and the mRNA after the addition of the progesterone inhibitor, mifepristone. With these findings, we conclude that steroid hormones due to the modifications in the cytokine patterns expressed by PR and ER positive cells in the tumor microenvironment alters IDO expression.

KEYWORDS: Breast cancer, Reproductive hormones, Immuno-invasion, Mifepristone, Tamoxifen.

Lista de Figuras

- Figura 1- Esquema hipotético mostrando a ação da progesterona nos linfócitos. A progesterona liga-se ao seu receptor (PR) na membrana dos linfócitos, atravessa a membrana celular, se liga no DNA promovendo a estimulação de fatores de transcrição, os quais estimulam a produção da proteína PIBF.....29
- Figura 2- Esquema hipotético mostrando a ativação do NFκβ pelo estrógeno, em que o hormônio provoca a fosforilação da proteína pI3K, os quais estimulam a família dos IKKs que se ligam à proteína NFκβ, que por sua vez vai se ligar no gene alvo responsável pela sua produção.....31
- Figura 3- Em 1, 7 e 10, fotomicrografias do carcinoma túbulo papilífero grau II (Bar. 200 μm), identificando os túbulos mamários com a presença de células atípicas (setas). Em 2, 8 e 11, carcinoma túbulo papilífero grau II. Imunomarcação para IDO localizada nos túbulos mamários (setas). Técnica de estreptavidina-biotina- peroxidase contra corada por Hematoxilina de Harris. IHQ, Bar.200 μm. Em 4, carcinoma solido grau I, com a presença de células atípicas e pleomorfismo celular. Em 5, carcinoma sólido. Observar nas células a presença de múltiplos grânulos intracitoplasmáticos (setas). Imunomarcação para IDO. Técnica estreptavidina-biotina peroxidase contra corada por Hematoxilina de Harris. Bar. 120 μm. Em 3, 6, 9 e 12, controles negativos.....45
- Figura 4- Gráficos referentes à expressão gênica dos receptores de estrógeno (ERα e ERβ) e progesterona presentes nas células do microambiente do carcinoma mamário de cadelas nos quatro tumores utilizados. Nos quatro tumores analisados a expressão de receptores de estrógeno β foi mais elevada que os receptores de estrógeno α, já os receptores de progesterona, identificados nos quatro microambientes, teve uma menor expressão no tumor 2.....47

Figura 5-	Exemplos de aquisições em dot plot evidenciando o controle do anticorpo secundário (anti goat-FITC-BluFL1) utilizado para a marcação da IDO nas células presentes no microambiente do carcinoma mamário de cadelas. Em A seleção da população a ser analisada (gate); em B presença de um histograma evidenciando a não reação cruzada do anticorpo secundário com as células do respectivo microambiente; em C histograma mostrando a viabilidade celular.....	48
Figura 6-	Exemplos de aquisições em dot plot. Desenvolvimento da curva dose resposta referente à expressão da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase presente nas células do microambiente do carcinoma mamário de cadelas após a suplementação com as diferentes dosagens (10µM; 25µM; 50µM) dos referidos compostos (estrógeno; progesterona; tamoxifeno; mifepristone).....	49
Figura 7-	Gráficos ilustrando a curva dose resposta da expressão da IDO nas células do microambiente do carcinoma mamário de cadelas submetidas à diferentes doses dos respectivos tratamentos. Nos gráficos nota-se a expressão de IDO nas células presentes no microambiente do carcinoma mamário de cadelas submetidas aos diferentes tratamentos: 1 (estrógeno); 2 (progesterona); 3 (tamoxifeno); 4 (mifepristone), nas diferentes dosagens (10µM; 25 µM; 50 µM).....	50
Figura 8-	Exemplos de aquisições em dot plot evidenciando o controle do anticorpo secundário (anti goat-FITC-BluFL1) utilizado para a marcação da IDO nas células presentes no microambiente do carcinoma mamário de cadelas. Em A seleção da população a ser analisada (gate); em B presença de um histograma evidenciando a não reação cruzada do anticorpo secundário com as células do respectivo microambiente; em C histograma mostrando a viabilidade celular.....	51
Figura 9-	Exemplos de aquisições em histograma. Verificação da expressão de IDO nas células presentes no microambiente do carcinoma mamário de cadelas nos diferentes tempos propostos (2h; 6h; 12h; 24h).....	51

Figura 10-	Expressão da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase- IDO nas células do microambiente do carcinoma mamário de cadelas em cultivo nos diferentes tempos propostos.....	52
Figura 11-	Imagem das marcações de IDO (47 Kd) pela técnica do western blot, seguida por imagens da mesma membrana mostrando o controle endógeno (B-Actina-50 Kd).....	52
Figura 12-	Quantificação da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase presente nas células do microambiente tumoral (n=4) 24 horas após a suplementação com E2 (estrógeno) P4 (progesterona); Mife. (mifepristone); Tamox. (tamoxifeno). A significância estatística baseia-se nos efeitos provocados pela adição dos compostos (progesterona e estrógeno) nas células tumorais, bem como nos efeitos provocados pela adição dos bloqueadores dos receptores hormonais (tamoxifeno e mifepristone) sobre as células estimuladas com estrógeno e progesterona. Dados apresentam as médias $\pm$ desvio padrão da expressão relativa da proteína. (n=4 [3 repetições]) **p<0.01; *p<0.05.....	53
Figura 13-	Expressão genica da indoleamina 2,3 dioxygnase (IDO) em células do microambiente dos 4 carcinomas mamários de cadelas analisados, 24 horas após a adição dos respectivos tratamentos: SC (sem tratamento), E2 (estrógeno), P4 (progesterona), Mife. (mifepristone) e Tamox (tamoxifeno). Dados apresentam as médias $\pm$ desvio padrão da expressão relativa dos genes (n=12 [3 repetições]) **p<0.01; p<0.05.....	55
Figura 14-	Controles utilizados nas análises feitas pela citometria de fluxo. Em A, gate com a população selecionada a ser analisada; em B controle negativo para o Fitc –blu-fl1; em C controle negativo para o PE-red-fl3; em D marcação das células viáveis em Viol-fl1.....	57
Figura 15-	Análise das células presentes no microambiente tumoral. Exemplos de aquisições em dot plot. No gráfico 1 realizou-se a seleção da população a ser analisada (gate); a partir	

da população pré selecionada no gráfico 1, selecionou-se a população positiva marcada com os devidos anticorpos primários para identificar os linfócitos (2); no gráfico 3 foi feito um histograma identificando a população leucocitária IDO-positiva.....57

Figura 16- Valores percentuais da expressão da IDO frente aos diversos tratamentos obtidos pela citometria de fluxo nos quatro grupos estudados. (n=12 [3 repetições]). Dados apresentam as médias $\pm$ desvio padrão da expressão relativa da IDO (n=12) **p<0.01; *p<0.05.....63

Lista de Abreviaturas

% - porcentagem

< - menor

≥ - maior ou igual

°C - graus Celsius

µg - micrograma

µl - microlitro

AKT -proteína quinase B

ANOVA - análise de variância

B7- peripheral membrane protein

BSA - albumina sérica bovina

CCL3- Motif Chemokine Ligand 3

CD25- cluster of differentiation 25

CD28- cluster of differentiation 28

CD4 – cluster of differentiation 4

CD8 - cluster of differentiation 8

COX1 – Cytochrome c oxidase I

COX2 - Cytochrome c oxidase II

CXCR2- Chemokine receptor 2

CXCR3- Chemokine receptor 3

DCs- células dendríticas

DNA ácido desoxirribonucleico

ERα – estrogen receptor alfa

ERβ- estrogen receptor beta

FAS-L- Fas ligand

FKBP52- Binding Protein 4

FYC- tirosina quinase pertencente à família proteica SRC

GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HSP90- heat shock protein 90

IDO- indoleamina 2,3 dioxygenase

IFN- γ - interferon gama

IL-1- interleukin 1

IL-10- interleukin 10

IL-12- interleukin 12

IL-6- interleukin 6

IRAK-1- Interleukin-1 receptor-associated kinase 1

ITIM- tyrosine-based inhibitory motifs

JAK- Janus kinase

M1- macrófagos tipo 1

M2- macrófagos tipo 2

MAPK- Mitogen-activated protein kinase

MHC-I- complexo de histocompatibilidade maior 1

M – molar

mRNA- ácido ribonucleico mensageiro

mTOR- mechanistic target of rapamycin

NF- κ B- nuclear factor NF kappa B

NK- natural killer cells

PCR- reação em cadeia pela polimerase

PDK- pyruvate dehydrogenase kinase

PD-L1- Program death-ligand

PGF2 α - prostaglandina 2 α

PI3K- phosphoinositide 3-kinase

PIBF- Progesterone-Induced Blocking Factor

RNA - ácido ribonucleico

SDS - dodecil sulfato de sódio

SH2- Src homology region 2

SRC- Proto-oncogene tyrosine-protein kinase

STAT- signal transducers and activators of transcription

TGF- β - Transforming growth factor beta-1

Th1- linfócito T-helper 1

Th2- linfócito T-helper 2

TNF- tumor necrosis factor

VEGF- vascular endothelial growth factor A

YMXM- substrate specificity of the insulin receptor kinase MXM

YXXM- substrate specificity of the insulin receptor kinase XXM

Sumário

1. Introdução	19
2.Revisão de Literatura	21
2.1 Microambiente tumoral.....	21
2.2 Carcinoma Mamário	24
2.3 Progesterona e Estrógeno.....	28
2.4 Indoleamina 2,3 Dioxigenase.....	31
3. Objetivos	35
3.1 Gerais	35
3.2 Específicos	35
4. Material e Métodos	36
4.1 Obtenção do Material Biológico	36
4.2 Exame Anatomopatológico.....	36
4.3 Cultivo Celular.....	37
4.4 Citometria de Fluxo	39
4.5 Imuno-Histoquímica	39
4.6 Hematoxilina e Eosina	40
4.7 Western Blot	41
4.8 PCR em Tempo Real	43
5. Resultados	45
5.1 Imuno-Histoquímica	45
5.2 Receptores de Estrógeno e Progesterona	47
5.3 Curva Dose Resposta	48
5.4 Expressão de IDO x Tempo de Cultivo.....	51
5.5 Western Blot.....	52
5.6 PCR em tempo real.....	55
5.7 Citometria de Fluxo.....	57
6. Discussão	68
7.Conclusões.....	71
8. Referências.....	73

1. INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado como uma doença ocasionada pela mutação no genoma das células normais devido a fatores como erros espontâneos na replicação do DNA, ação de agentes químicos, como alguns metais e radiação. Naturalmente, quando o sistema imunológico percebe a presença de células alteradas, inicia-se uma resposta contra as mesmas, o que deveria ser suficiente para eliminá-las. No entanto, por diversos mecanismos, as células tumorais são capazes de resistir às defesas desencadeadas pelo sistema imunológico do hospedeiro, favorecendo o crescimento dos tumores (LANDSKRON et al., 2014).

O carcinoma mamário simples é o tipo de câncer de maior incidência em cadelas, com um alto índice de morbidade e mortalidade. Tais tumores podem acometer uma ou mais glândulas mamárias, sendo complicado o seu diagnóstico devido à sua grande variedade morfológica (SLEECKX et al., 2014).

A enzima indoleamina 2,3 dioxigenase tem sido relacionada aos tumores por favorecer o seu desenvolvimento devido ao seu efeito imunomodulador (MUNN et al. 2004, OCHSENBEIN, 2005; CHEN, 2011). A ação da enzima no microambiente tumoral, impede a ativação e proliferação dos leucócitos devido à quebra do triptofano e a consequente produção de quinurenina, um catabólito oriundo da quebra deste aminoácido, que é tóxico, principalmente para as células T ativadas (MUUN, MELLOR, 2007; LEI et al., 2013; ISLA LARRAIN et al., 2014; MELLOR, MUN, 2015; CAMPPIA et al., 2015; ASGHAR et al., 2017).

Tais tumores mostram uma relação direta com os hormônios esteroides (estrógeno e progesterona), os quais podem alterar o padrão de citocinas produzidas por células que possuem receptores para os mesmos. Estas citocinas podem elevar ou diminuir a expressão de IDO no microambiente tumoral, em que a enzima é capaz de agir para beneficiar o desenvolvimento das células tumorais, impedindo que as mesmas sejam atacadas pelas células do sistema imunológico (FALLARINO et al., 2006; JACQUEMIER et al, 2012; OBR et al, 2014).

A progesterona e o estrógeno são importantes para o desenvolvimento tumoral (WILLIAMS, LIN, 2013). A progesterona é conhecida pelo seu efeito modulador sobre o sistema imunológico, favorecendo um perfil anti-inflamatório com consequente produção de

citocinas anti-inflamatórias pelos linfócitos Th2, presentes no microambiente tumoral (SZEKERES-BARTHO et al., 2009; LANDSKRON et al., 2014).

O estrógeno age nas células tumorais e nas células imunológicas presentes no microambiente tumoral pela ligação com os seus receptores específicos (ER α e ER β). Tal ligação ocasiona uma mudança de perfil, em que as células elevam a produção de citocinas pró-inflamatórias (STRAUB et al., 2007).

Sabendo que a progesterona e o estrógeno atuam nas células presentes no microambiente do carcinoma mamário de cadelas, hipotetizou-se que, após estímulo com tais hormônios, ocorreria uma mudança no perfil de citocinas produzidas pelas células imunológicas circundantes ao tumor, interferindo positivamente e/ou negativamente na regulação da expressão de IDO neste microambiente.

Nesse contexto, avaliou-se a expressão da IDO nas células tumorais e nos leucócitos no microambiente tumoral do carcinoma mamário de cadelas, bem como o seu comportamento frente à suplementação exógena com progesterona, estrógeno, mifepristone e tamoxifeno. A expressão da IDO foi estimada pelas técnicas de imuno-histoquímica, citometria de fluxo e western blot e, foi feita a mensuração da expressão de mRNA pela técnica de Real Time PCR.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MICROAMBIENTE TUMORAL

O microambiente tumoral é formado por células malignas e não malignas como as células endoteliais e os fibroblastos, além de grande quantidade de fatores solúveis (ROMERO et al., 2017). Existem vários tipos tumorais, em que os microambientes são específicos para cada um. Nesses, são secretados diferentes padrões de citocinas, as quais estimulam o recrutamento de células imunológicas (leucócitos) para o estroma tumoral (DEL PRET et al., 2017). Com a interação entre as células do microambiente tumoral (malignas, não malignas e imunológicas), ocorre um processo inflamatório crônico, junto com a angiogênese, (BACHELERIE et al., 2014) estimulando assim o crescimento do tumor (MONTOVANI et al., 2008).

As células tumorais são capazes de se adaptarem ao corpo do hospedeiro, em que desempenham mecanismos capazes de escapar das respostas imunológicas. Conseguem driblar o sistema imunológico pela estimulação positiva de várias moléculas, incluindo a PD-L1, a indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) e, pela estimulação negativa do MHC-Classe I (KUOL et al., 2017). A regulação negativa do MHC- Classe I nas células tumorais é um dos mecanismos mais conhecidos pelo qual o tumor desenvolve o processo de imunoevasão. No câncer mamário, a pouca presença do MHC- Classe I está relacionada à maior incidência de processos metastáticos (KANEKO et al., 2011).

A presença de células imunológicas no microambiente tumoral favorece os processos de evasão. Estas são capazes de expressar fatores imunossupressivos, como a citocina IL-10, fator de crescimento tumoral beta (TGF- β) e a prostaglandina E2 (PGF2 α) (LEVANO et al., 2011; WEI et al., 2015), sendo capazes de estimular um perfil imunorregulador.

Monócitos circulantes respondem a abundância de citocinas circulantes e fatores de crescimento produzidos pelas células tumorais e pelos componentes do microambiente tumoral, como as células endoteliais e os fibroblastos. Os macrófagos presentes neste microambiente parecem ser originados dos monócitos circulantes, em que são caracterizados

por uma grande heterogenicidade e plasticidade, podendo interagir de várias maneiras com as células tumorais (OVERMEIRE et al., 2016). No momento em que os monócitos alcançam o estroma tumoral, podem se diferenciar em macrófagos do tipo 1 (M_1) ou macrófagos do tipo 2 (M_2). Os M_1 secretam grande quantidade de IL-12 e pouca quantidade de IL-10, já os (M_2) secretam baixa concentração de IL-12 e alta concentração de IL-10 (MURRAY et al., 2014). Nos tumores, os macrófagos são estimulados ao favorecimento do perfil M_2 , (anti-inflamatório) (SOUZA et al., 2015), devido à presença de citocinas, como o TGF- β e a IL-10, que exerce seus efeitos pelo bloqueio da liberação de citocinas pró-inflamatórias (Th1), bem como do NF- $K\beta$. Por sua vez, as células tumorais utilizam a IL-10 para inibir a ativação das células T no microambiente tumoral e suprimir a expressão de IL-12 pelas células dendríticas presentes neste microambiente (RUFFEL et al., 2014), resultando no crescimento da neoplasia (GROUX et al., 1998; MANTOVANI et al 2002; GRUGAN et al 2012; SUN et al., 2015; YANG et al., 2015).

Nos cães, os neutrófilos, conhecidos como os leucócitos mais abundantes na circulação, são encontrados ao redor dos tumores (SIONOV et al., 2015). São recrutados para o tumor devido a produção de vários fatores quimiotáticos produzidos pelas células tumorais (POWELL et al., 2016). Alguns receptores quimiotáticos, como o CXCR2 e o CXCR3, foram identificados nos neutrófilos, sendo responsáveis por estimular a sua migração para os sítios tumorais (SPARMANN et al., 2004).

As células dendríticas presentes no microambiente tumoral, buscam iniciar uma resposta imunológica contra as células tumorais. Algumas quimiocinas estão relacionadas com o recrutamento das células dendríticas, principalmente a CCL3 responsável por recrutar DCs imaturas. Devido ao estímulo presente no microambiente tumoral as DCs são direcionadas à desenvolverem um perfil tolerogênico, favorecendo a progressão do tumor pela indução das células T reguladoras (ROBERTS et al., 2016).

As células natural killer, importantes por seu efeito citotóxico, são conhecidas, também, por possuir um papel imunomodulador. São divididas em duas populações: as que produzem grande concentração de citocinas (NK CD56+) e as que produzem uma menor quantidade de citocinas (NK CD56-). No microambiente tumoral, tanto as células tumorais quanto as células imunológicas são capazes de alterar o fenótipo das células NK, bloqueando a sua atividade citotóxica, favorecendo a evasão das células tumorais (MANTOVANI et al., 2008).

Os fibroblastos são de fundamental importância para o desenvolvimento do tumor. São os componentes principais do estroma tumoral, participando na modulação do

crescimento do mesmo. Estas células participam da imunossupressão provocada no microambiente tumoral (TAKAHASHI et al., 2015; HE et al., 2016;).

Células T regulatórias (CD25+CD4+) são relevantes para o tumor devido a supressão que as mesmas causam nas células T efectoras (YAGI et al., 2004). Desempenham o seu papel pelo favorecimento do escape tumoral, por inermédio da secreção de fatores, como o PD-1, IL-10 e TGF- β (WEI et al., 2015).

O balanço entre fatores co-estimulatórios e co-inibitórios é importante para o desenvolvimento ou não de uma resposta imunológica. As células tumorais são capazes de utilizar os mecanismos co-inibitórios para inibir várias moléculas de superfície celular (MHC-Classe I, B7 e CD28) que, em uma reação imunológica normal, serviriam para iniciar uma resposta (JANAKIRAM et al., 2012).

O PD-L1, uma proteína transmembrana importante na supressão do sistema imunológico, ao interagir com o seu receptor PD-1 presente nas células T, leva tais células à apoptose. No entanto, nas células tumorais o PD-L1 age como um fator anti-apoptótico, levando as mesmas a tornarem-se resistentes a tais mecanismos, bem como a drogas que o estimulam à apoptose (KUOL et al., 2017).

A expressão do PD-L1 é estimulada pelo IFN- γ oriundo das células imunológicas infiltradas no microambiente tumoral (NOGUCHI et al., 2017). Ainda, moléculas como o NF-K β , MAPK, PI3K, mTOR, JAK, transmitem um sinal de ativação para o fator de transcrição STAT, o qual atua via receptores do IFN- γ e toll-like, regulando a translocação nuclear dos fatores de transcrição referentes a produção do PD-L1, estimulando a produção do mesmo (RITPRAJAK et al., 2015). Com a regulação positiva do PD-L1 as células Tregs sofrem um estímulo, pela fosforilação do mTOR e do AKT, fazendo com que haja menos resposta celular contra as células tumorais.

A expressão da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase também está relacionada com os mecanismos de imunoevasão das células tumorais (CHEN et al., 2014). É conhecida por provocar o catabolismo do aminoácido L-triptofano, privando as células presentes em determinado microambiente deste composto, inibindo, consequentemente, a ativação das células T efectoras, favorecendo, desse modo, a imunoevasão (FALLARINO et al., 2006). A expressão de IDO está associado fortemente aos receptores de estrógeno e fracamente aos receptores de progesterona, em que a baixa expressão da mesma (IDO) está correlacionado à uma porcentagem baixa de receptores estrogênicos (SOLIMAN et al., 2013).

A ciclooxigenase 2 (COX-2) é uma enzima responsável pela produção de prostaglandina e leucotrienos, sendo expressa por vários tumores, incluindo os tumores de

mama (JANA et al., 2014). Esta enzima é conhecida pelos seus efeitos sobre a supressão das células T, NK e das células dendríticas, favorecendo, desse modo, a evasão tumoral. A prostaglandina (PGF2 α) é tida como participante dos mecanismos de crescimento tumoral, devido a sua capacidade de interromper a migração das células NK para o sítio tumoral e, também, por estimular a secreção de IFN- γ (HOLT et al., 2012).

O fator de crescimento tumoral produzido pelos macrófagos é conhecido por favorecer o crescimento tumoral (DERYNCK et al., 2001). O TGF- β estimula preferencialmente as células com perfil Th2 ao invés do perfil Th1, favorecendo o não desenvolvimento de uma resposta imunológica contra as células malignas, visto que as células Th2 possuem um perfil anti-inflamatório. Regula também a expansão das células NK e dos macrófagos, favorecendo a não atividade citolítica das células NK, bem como, estimulando macrófagos com perfil M₂ (MAEDA et al., 1996). Além disso, o TGF- β é capaz de inibir várias moléculas citolíticas, como o FAS-L e o IFN- γ , suprimindo a lise das células tumorais pelos linfócitos TCD8 (THOMAS et al., 2005). As vias pelas quais o TGF- β provoca tais efeitos inibitórios são a IL-6/STAT3 e PI-3K/AKT (STEPHEN et al., 2014).

2.2. CARCINOMA MAMÁRIO

As neoplasias mamárias são o tipo mais frequente de tumores nas fêmeas (MARIA et al., 1998; DE NARDI, 2002). Os diagnósticos malignos mais comuns variam, e o tipo mais comumente encontrado é o carcinoma (MISDORP et al., 1999; PÉREZ-ALENZA et al., 2000; RUTTEMAN et al., 2001).

Para a progressão do tumor mamário, suas células lançam mão de algumas habilidades, como o estímulo à inibição da apoptose e à proliferação, indução da angiogênese com consequente prevenção à hipóxia e, inibição do sistema imunológico evitando o reconhecimento das células tumorais pelas células imunológicas (HANAHAHAN et al., 2011).

A via do colesterol exerce um papel bastante importante na manutenção e no desenvolvimento do câncer mamário (HANUKOGLU et al., 1992; NELSON et al., 2013), pois está relacionada à regulação da sinalização celular, ativação de oncogenes, sinalização hormonal, inflamação e com a resposta imunológica. O colesterol e os seus metabólitos tem grande participação na produção de muitas moléculas, as quais são de fundamental importância para o desenvolvimento do tumor, uma vez que integram grande parte da região estrutural e fluida das membranas celulares e são importantes na formação de sítios para

ligação hormonal. Dessa forma, pode-se sugerir que o colesterol e seus metabólitos exercem um papel fundamental na tumorigênese (LINGWOOD et al., 2010).

Outro fator participante no desenvolvimento dos tumores, de um modo geral, é o VEGF, considerado regulador da angiogênese tumoral. Possui a capacidade de atuar como agente mitogênico e estimulador da proliferação de células endoteliais, sendo capaz de atrair monócitos para região tumoral (FERRARA et al., 2003; SHIBUYA et al., 2006). Os tumores são conhecidos por requererem, para o seu desenvolvimento, fatores angiogênicos para estimular a formação de novos vasos sanguíneos, o qual é secretado por inúmeros tipos de câncer, incluindo o câncer de mama (ARIAS-PULIDO et al., 2012; JI et al., 2014).

A relação dos mecanismos inflamatórios com o desenvolvimento dos tumores vem sendo bastante considerada. A inflamação crônica é relatada por favorecer o desenvolvimento dos tumores mamários. A relação do câncer com a inflamação é caracterizada pela infiltração de células imunológicas, em que predominam os macrófagos e as células dendríticas, onde na presença de mensageiros polipeptídicos da inflamação, como a IL-1 e o TNF- α , produzem estímulos para a remodelação tecidual e angiogênese (RIUS et al., 2008; HARRISON et al., 2007).

Duas vias são consideradas na correlação entre a inflamação e o câncer, a primeira delas, denominada de via intrínseca, ativa oncogenes que levam a produção de agentes inflamatórios, os quais são responsáveis por construir um microambiente inflamatório. Já a via considerada extrínseca à condição inflamatória promove o desenvolvimento tumoral direto, estimulando a ação do fator de transcrição NF κ B e da citocina TNF- α (RIUS et al., 2008).

Em casos de câncer, é de fundamental importância que se caracterize lesões benignas e lesões malignas. Lesões benignas podem ser encontradas com frequência na mama, sendo as mais comuns os fibroadenomas, doença fibrocística e ductasia ectal. A ductasia ectal é considerada comum e sua causa não é totalmente conhecida. É caracterizada pela dilatação dos grandes ductos e normalmente é encontrado um infiltrado inflamatório nos ductos acometidos e uma fibrose pode vir a acometer tal região. A doença fibrocística, considerada não maligna, pode causar fibrose no local acometido com consequente formação de cistos e um aumento do número de células epiteliais. Pode ser limitada pela formação do cisto ou por formações fibrocísticas com áreas de escaras na pele. Os adenomas são caracterizados como lesões agrupadas de células epiteliais, em que na maioria das vezes, possui caráter benigno (MALLON et al., 2000).

A hiperplasia epitelial é considerada um dos primeiros passos para o desenvolvimento do carcinoma mamário. Resultam em um aumento na proliferação das células epiteliais e das células dos ductos interlobulares. Em uma hiperplasia severa as células epiteliais se proliferam intensamente, bloqueando o lúmen dos ductos mamários (MAKKI, 2015).

O carcinoma ductal in situ é caracterizado por uma proliferação das células epiteliais malignas, as quais ficam contidas dentro das estruturas do epitélio mamário, em que o estroma tumoral não se infiltra em outras regiões da mama. Por isso, as células malignas não têm acesso a regiões linfáticas ou vasculares estando unicamente dentro do estroma tumoral. Existe uma pequena diferença entre o carcinoma ductal in situ e o carcinoma lobular in situ, considerado uma proliferação de células epiteliais na região terminal da unidade do ducto lobular e caracterizadas por ficarem na mesma área da mama, não tendo registros de migração das células neoplásicas. Ainda, o carcinoma lobular in situ é considerado uma proliferação regular, em que as células se expandem para os ácinos ductais obliterando o lúmen do ducto.

O carcinoma microinvasivo é a forma mais próxima do carcinoma invasivo. É caracterizado por um foco medindo cerca de 1mm de diâmetro. A lesão provocada por este tipo de carcinoma possui uma baixa incidência no acometimento dos linfonodos e em provocar processos metastáticos, apresentando um prognóstico excelente (MARDEKIAN et al., 2015).

O carcinoma ductal invasivo está em torno de 60 a 80% de todos os tipos de câncer de mama. São caracterizados por um grande infiltrado de células e fatores de crescimento e uma concentração considerável de fibrose e elastose.

A classificação dos carcinomas esta subdividida em três parâmetros, em que cada um possui uma classificação de 1-3. O primeiro parâmetro leva em consideração a formação tubular pelo tumor, cerca de 75% da lesão possui esta formação, os núcleos pequenos, cromatina regular e pequena variação no tamanho; no grau 2 ocorre formação de túbulos em cerca de 10 e 75% do tumor, células são maiores que o normal e núcleos com tamanhos e forma moderadamente alterados, o grau 3 menos de 10 % do tumor possui formação de túbulos, as células são multinucleadas, assumem formas bastante diferenciadas com grande variação no tamanho e na forma dos núcleos (MAKKI, 2015).

Muitos tumores mamários são de origem epitelial (adenoma simples e carcinoma simples), alguns são formados por tecidos epiteliais e mioepiteliais (adenoma complexo e carcinoma complexo) e uma pequena quantidade são de origem mesenquimal

(fibroadenoma, fibrossarcoma, osteossarcoma). O termo adenocarcinoma é utilizado em tumores malignos epiteliais tubulares e papilares, em que o seu arranjo é predominantemente glandular, possuindo um lúmen subdividido em tipos papilares e tubulares. A diferenciação entre tumores malignos e benignos levam em consideração algumas características. Os tumores benignos possuem um crescimento invasivo e normalmente são encapsulados, já os tumores malignos apresentem quadros de necrose, células diferenciadas, pleomorfismo nuclear e alta densidade vascular (SLEECKX et al., 2014).

Os tumores mamários são considerados uma das doenças mais comuns em cadelas. Embora a prevalência dos cânceres mamários esteja caindo nas regiões com uma maior incidência da ovariosalpingoesterectomia, ainda permanece como uma patologia a ser considerada em medicina veterinária (SLEECKX et al., 2011).

As glândulas abdominais caudais e inguinais são as mais afetadas, em que múltiplos tumores podem acometer o mesmo animal (SORENMO et al., 2009).

Em um estudo feito por Sorenmo et al. (2009) os tumores malignos foram encontrados com maior frequência em animais mais velhos e, com um maior tamanho quando comparados com os tumores benignos. Os casos não malignos foram estudados periodicamente, mostrando que o mesmo pode evoluir para uma forma maligna. Ainda animais com um histórico de tumores não malignos tem uma maior chance de desenvolverem uma neoplasia maligna devido à glândula estar exposta a mesma quantidade de hormônios que foi capaz de estimular o desenvolvimento de uma neoplasia não benigna (MOUSER et al., 2010).

Diferentes fatores podem influenciar o desenvolvimento dos tumores de mama em cadelas. Fatores como a idade, raça, predisposição genética, exposição a hormônios e fatores de crescimento, expressão da cicloxigenase -2 e a alimentação (RIVERA et al., 2009) estão entre os mais comuns.

O tumor mamário de cadelas é hormonalmente controlado. Hormônios esteroides estimulam o crescimento da glândula mamaria em condições fisiológicas. O efeito proliferativo no epitélio glandular pode criar condições para o desenvolvimento da neoplasia. Estrógenos promovem o crescimento ductal e a progesterona estimula o desenvolvimento lóbulo-alveolar da glândula mamaria. Ambos os hormônios exercem seus efeitos na glândula mamaria devido a ligação com os seus receptores específicos (PRs e ERs), presente tanto no tecido glandular normal quanto nos tecidos neoplásicos (SLEECKX et al., 2011).

A Ciclooxygenase-2 está relacionada com o desenvolvimento e progressão dos tumores mamários, sendo expressa nos tumores de mama de cadelas (QUEIROGA et al., 2010). Normalmente é ausente em células normais, sendo induzida por fatores de crescimento, respostas inflamatórias, promotores de tumores e oncogenes (DIAS PEREIRA et al., 2009).

2.3. PROGESTERONA E ESTRÓGENO

Hormônios são conhecidos por regular a função, o metabolismo, o crescimento e a diferenciação celular. Seu impacto no crescimento tumoral pode ser direto, quando age nas próprias células tumorais ou indireto, quando desempenha suas funções nas células imunológicas que circundam o tumor. A maioria dos tecidos tumorais demonstram quase total dependência, no que se concerne ao seu crescimento, aos hormônios esteroides (REZNIKOV, 2015).

A progesterona participa de vários mecanismos fisiológicos no organismo dos mamíferos. É produzida pelas células da granulosa e do corpo lúteo no ovário. Além do seu papel essencial na manutenção da gestação, uma série de estudos tem demonstrado sua participação em atividades imunológicas supressivas/reguladoras (BARRERA, ÁVILA, DIAS, 2007; SU et al., 2009; OBR et al., 2012).

Este hormônio contribui com a regulação dos linfócitos, possuindo efeitos inibitórios diretos ou indiretos sob a proliferação deste tipo celular. Estimula também a produção de células dendríticas imaturas, as quais são responsáveis pela indução de células T reguladoras, diminuindo a ação das células T efectoras (LIANG et al., 2006), colaborando, consequentemente, com a resistência imunológica dos tumores (LANDSKRON et al., 2014).

A progesterona participa de um mecanismo de inibição da produção de fatores pró-inflamatórios pelos linfócitos, onde forma um complexo hormônio-receptor após atravessar a membrana celular dos mesmos. Tal complexo se une ao DNA, estimulando fatores de transcrição, produzindo a proteína PIBF. Esta proteína bloqueia a ação da fosfolipase A2, evitando a liberação de ácido araquidônico, impedindo a produção de prostaglandina e/ou leucotrienos e de fatores pró-inflamatórios, incluindo a citocina IL-12, que estimula a produção de IFN- γ pelas células NK (BARTHO, WEGMANN, 1996) (Figura 1).

O ácido araquidônico, conhecido pelo papel crucial na inflamação e no câncer, pode inibir a atividade da indoleamina 2,3 dioxigenase - IDO em monócitos. Esse efeito é dose dependente da via COX1 e COX2, pois são essas enzimas as responsáveis pela sua produção. A interrupção na produção deste ácido leva à interrupção da fosforilação de

STAT-1, devido ao baixo nível de IFN- γ , que é o maior responsável pela sua fosforilação. A interrupção na fosforilação de STAT-1 leva a uma diminuição na produção de IDO, uma vez que a via JAK-STAT-1 é o principal meio de ativação da transcrição da proteína (BASSAL et al., 2012).

Fonte: adaptado de Bartho et al.

Figura 1: Esquema hipotético mostrando a ação da progesterona nos linfócitos. A progesterona liga-se ao seu receptor (PR) na membrana dos linfócitos, atravessa a membrana celular, se liga no DNA promovendo a estimulação de fatores de transcrição, os quais estimulam a produção da proteína PIBF.

O estrógeno, outro hormônio esteroide participante na regulação das células imunológicas, pode estar intimamente relacionado à expressão de IDO devido aos seus efeitos nas células dendríticas, nas células NK e nos macrófagos. Isto ocorre após à sua ligação em seus receptores (ER) presente nessas células, alterando a função das mesmas (IETTA et al., 2010), modificando a produção de citocinas e favorecendo a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IFN- γ) (SIRACUSA et al., 2008) .

A presença da insulina é importante para que o estrógeno desempenhe suas funções, pois são conhecidos os efeitos da mesma sobre os receptores estrogênicos, a qual, leva a um estímulo positivo do ER α , levando a uma ativação da via AKT-PI3K, que também está relacionada à expressão de IDO (BOWERS et al., 2013; LI et al., 2017). Está envolvida com um estímulo à esteroidogênese, em que há a associação da IRS1 com a PI3K pela interação

com os sítios de ligação YMXM/YXXM e SH2 (MUKHERJEE et al., 2017). A PI3K, já é descrita por sua interação com o E2 via fosfatidilinositol-trifosfato e 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK (PDK1)) que ativa AKT (SCHEID; SCHEID et al., 2002).

A prolactina é conhecida por facilitar a ação mitótica do estrógeno, elevando o número de seus receptores. Assim, o estrógeno promove o crescimento celular devido a estimulação na liberação do fator de crescimento tumoral α e no fator estimulador da produção de insulina. Tais fatos correlacionam o estrógeno ao favorecimento das neoplasias hormônio-dependentes, como os tumores mamários, pois tal hormônio está ligado à alterações no sistema imunológico e no crescimento celular (SILVA et al., 2004).

Mediante a ligação do estrógeno com os seus receptores (ERs) ocorre a transcrição de várias proteínas, em um processo bastante complexo que envolve inúmeros fatores co-regulatórios. Os mesmos (ERs) tornam-se ativados por um processo que envolve as proteínas chaperonas, mudança conformacional, dimerização e ligação dos ERs com os genes alvo. Quando os ERs não estão ativados ficam na forma de um heterocomplexo constituído pelas proteínas de choque térmico (HSP90) e pelas FK-imunofilina (FKBP52). As proteínas de choque térmico estão relacionadas à manutenção estrutural dos receptores de estrógeno em uma conformação apropriada para que possam responder rapidamente aos estímulos hormonais. Após a ligação do estrógeno com os seus receptores, as HSP90 e as FK-imunofilinas se dissociam, alterando o receptor em sua conformação, tornando-o ativo (BOTELHO et al., 2015; RAPHAEL et al., 2017; AUGEREAU et al., 2017).

A exposição celular ao estrógeno induz a uma resposta pró-inflamatória, estimulando a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-12, IL-1b) e uma alteração no estímulo ao NF κ B, principalmente nas células dendríticas (DAÍ et al., 2015) (Figura 2). Porém, o efeito do estrógeno como imunomodulador depende do tipo de estímulo, dos órgãos alvo, expressão dos subtipos de receptores (ER α ou ER β) e da concentração hormonal (PRIYANKA et al., 2015).

Fonte: adaptado de Bartho et al

Figura 2: Esquema hipotético mostrando a ativação do NFκβ pelo estrógeno, em que o hormônio provoca a fosforilação da proteína p13K, os quais estimulam a família dos IKKs que se ligam à proteína NFκβ, que por sua vez vai se ligar no gene alvo responsável pela sua produção.

2.4. INDOMEAMINA 2,3 DIOXIGENASE

As oxigenases são enzimas que catalisam a incorporação de um átomo de oxigênio (O_2) na molécula do triptofano, causando a quebra deste composto por uma reação de oxidação (KUDO et al., 2004). É amplamente expressa nos tecidos dos mamíferos (células do trofoblasto, alguns tumores, tecido uroepitelial, leucócitos polimorfonucleares e células dendríticas) (MELLOR, MUNN, 2001; KUDO et al., 2004; MUNIR et al., 2012). Apresenta capacidade de catabolizar o aminoácido triptofano, o que impede a proliferação das células T efectoras pela carência deste componente, como ocorre no microambiente tumoral (MELLOR; MUNN et al., 2001; OPITZ et al., 2011). Contudo, o principal mecanismo pela qual exerce seu efeito reside na geração de compostos tóxicos do catabolismo do triptofano, a exemplo da quinurenina que induz células T ativadas à apoptose (KUDO; BOYD; et al., 2004; KUDO, HARA et al., 2004; JUHÁSZ et al., 2012).

Para que ocorra o catabolismo do triptofano pela IDO, torna-se necessário que sua expressão seja estimulada. O IFN-γ induz a atividade bioquímica e funcional da enzima, pois leva a expressão de genes que a produzem, fazendo com que haja uma estimulação à

degradação do triptofano em quinurenina (YOSHIDA et al., 1981; YASUI et al., 1986; KUDO, 2004; BOASO et al., 2005).

Sabe-se que a IDO possui imunomoduladores negativos regulados por sinalização proteica, as quais são carregadas para dois principais receptores presentes na molécula (IDO), os ITIMs 1 e 2 (immuno receptor tyrosine-based-inhibitory motifs) (CHEN, 2011). Duas vias de ativação destes imunorreceptores são conhecidas: a primeira desencadeada pela ação da citocina anti-inflamatória TGF- β e a segunda iniciada pela citocina IL-6 (PALLOTTA et al., 2011; SONG et al., 2014).

A primeira via se inicia quando o TGF- β , presente em determinado microambiente, ativa a proteína FYC, uma tirosina quinase pertencente à família proteica SRC. A proteína FYC se liga aos ITIMs na molécula de IDO, com consequente fosforilação dos mesmos. Após a fosforilação, os ITIMs atuarão como sítios imunológicos de ligação para as tirosina-fosfatases, proteínas mais conhecidas como SHP1 e SHP2 (CHEN, 2011).

Tal mecanismo estimula a via não canônica NF- κ B de ativação da IDO, ou seja, a via de ativação por citocinas anti-inflamatórias, como o TGF- β . Uma vez estimulado, o NF- κ B inibe o receptor IRAK-1 (IL-1 associated kinase) na molécula da IDO, conhecido por atuar na via de ativação canônica. Com isso, a via não canônica continua estimulando a produção de TGF- β que é capaz de elevar a expressão de IDO por estimular o gene que a produz (*ido1*), demonstrando que existe uma retroalimentação da via de ativação não canônica, que pode perpetuar a expressão de IDO por um longo período (PALLOTTA et al., 2011; CHEN, 2011).

Já, em condições inflamatórias, a citocina IL-6 vai estimular a proteína SOCS-3, que por sua vez, irá se ligar ao ITIM2. Tal ligação irá desencadear uma degradação proteossomal da IDO, causando uma redução dos seus efeitos (BABAN et al., 2009). Com a diminuição de IDO no meio, determinado microambiente deixa de ser imunologicamente privilegiado, ou seja, os linfócitos deixam de morrer devido a ação da IDO construindo um ambiente onde as defesas imunológicas naturais não serão inibidas.

Hormônios como a progesterona e o estrogênio, podem alterar a expressão de IDO em células imunológicas. Recentemente, foi demonstrado que, na presença da progesterona, a expressão desta enzima é alterada nas células imunológicas da interface materno fetal (BIANCHI et al., 2017); porém ainda não são conhecidas as possíveis vias em que a progesterona atua para causar este efeito neste microambiente.

Inicialmente, sabe-se que células imunológicas atuam na produção de citocinas, criando um microambiente particular para cada situação, dependendo da necessidade

(resposta pró-inflamatória ou anti-inflamatória). A família das células T-helper são muito importantes nesse processo, pois de acordo com os tipos de citocinas que as células imunológicas produzem, ocorre a diferenciação dos linfócitos T-helper em subgrupos conhecidos como Th1 ou Th2, que produzem diferentes tipos de resposta (DRUCKMANN, DRUCKMANN, 2005; XU et al., 2008).

Na presença da progesterona, os linfócitos pró-inflamatórios são atenuados, concomitante ao favorecimento de uma resposta imunológica desencadeada pelos linfócitos Th2, com a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 e TGF- β (ARCK et al., 2007). Já na presença de estrógeno, uma resposta pró-inflamatória é induzida, favorecendo a prevalência de linfócitos Th1, com consequente produção de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- γ , relacionando o estrógeno com a elevação da expressão da IDO (ANDERSON; HILL, 1996; ZHU et al., 2007; ARCK et al., 2007).

Porém, o favorecimento dos linfócitos Th1 ou Th2 e a subsequente produção de citocinas relacionadas ao tipo de resposta desencadeada por cada uma das subpopulações de linfócitos, até o presente momento, não esclarecem nenhuma via de estimulação ou inibição da expressão de IDO (SCHUST et al., 1996; ARCK et al., 2007).

Buscando melhor compreender os efeitos da progesterona e do estrógeno sob a expressão da IDO, autores como Orabona, Pallotta, Grohmann, (2012) investigaram outras vias de estimulação da enzima, descobrindo que o TGF- β exerce um efeito bastante positivo sob a expressão de IDO nas células dendríticas.

Mediante a presença de progesterona existe uma discreta diminuição ou, em alguns casos, a manutenção dos níveis de expressão de IDO (BIANCHI et al., 2017). Tal manutenção na expressão de IDO pode ser correlacionada com os efeitos indiretos da progesterona sob as células dendríticas, pois o TGF- β , produzido pelo linfócitos Th2, grupo celular favorecido pela progesterona, pode agir nas células dendríticas elevando a expressão de IDO (ORABONA et al., 2012), estabelecendo-se uma correlação entre a progesterona e a manutenção da expressão da IDO.

Outra forma que a progesterona poderia agir nas células para elevar a expressão de IDO seria pelos receptores nucleares presentes nestas células, conhecidos como PRs (BUTTS et al., 2010). Tais receptores são definidos como proteínas com alta afinidade para progesterona, podendo alterar as funções celulares. Podem atuar em duas vias, a primeira delas pela ação genômica, modulando a expressão gênica, e a segunda pela ativação de cascatas proteicas intracelulares (MESIANO, WANG, NORWITZ, 2011).

A ação genômica da progesterona pode ser regulada por ambos os mecanismos, sendo eles de ação direta ou de ação indireta. O mecanismo direto é mediado pelos receptores nucleares, que tem a função de ativar fatores de transcrição presentes no núcleo, podendo afetar a transcrição gênica, ou também, indiretamente, com a ligação em seus receptores citoplasmáticos, que estimulam moléculas sinalizadoras como as proteínas da família Src-quinases, capazes de se ligarem ao núcleo, estimulando fatores de transcrição (DANIEL, KNUTSON, LANGE, 2009).

Já a ação não genômica da progesterona, caracterizada por um tempo de resposta pequeno e por não requerer a síntese de RNA ou de proteínas, afeta a função celular pela ligação com os seus receptores de membrana que são diretamente conectados com as cascatas de sinalização intracelular (LIANG, et al., 2006; MESIANO et al., 2011).

Em relação ao estrógeno, sabe-se que o mesmo possui receptores nas células imunológicas, como nas células NK, nas células dendríticas e linfócitos TCD4 (IETTA et al., 2010) e, que tais células estão presentes no microambiente tumoral (OPITZ et al., 2011). Estas células, principalmente os linfócitos, mediante a presença do estrógeno, desenvolvem uma resposta pró-inflamatória capaz de elevar a expressão de IDO (BRUCE-KELLER et al., 2000). No entanto, ainda não é sabido se o estrógeno altera a expressão de IDO nas células presentes no microambiente do carcinoma mamário de cadelas.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAIS

- Verificar a ação dos hormônios esteroides (progesterona e estrógeno) sob a expressão da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase nas células presentes no microambiente tumoral.
- Identificar os possíveis mecanismos de ação desencadeados por estes compostos nas células do microambiente tumoral que podem levar a prováveis alterações na expressão de IDO.

3.2. ESPECÍFICOS

- Quantificar a enzima indoleamine 2,3 dioxigenase expressa pelas células presentes no microambiente tumoral submetidas à suplementação exógena com estrógeno e progesterona.
- Quantificar a enzima indoleamina 2,3 dioxigenase expressa pelas células do microambiente tumoral submetidas aos bloqueadores dos receptores da progesterona e do estrógeno (mifepristone e tamoxifeno)
- Fenotipagem das células imunológicas presentes no microambiente tumoral com concomitante verificação da expressão de IDO nestas células
- Identificar os receptores de estrógeno e progesterona nas células presentes no microambiente tumoral
- Quantificar a expressão gênica da IDO nas células presentes no microambiente tumoral pela técnica de PCR em tempo real

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Todos os procedimentos desse projeto foram aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animais – CEUA – FMVZ N° 5055170117. As amostras utilizadas foram oriundas de 15 cadelas submetidas à mastectomia total ou parcial. O local para coleta foi no Hospital Veterinário da Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo.

Vale ressaltar que todos os proprietários foram informados sobre o desenvolvimento da pesquisa, e quando autorizado, assinaram um termo de permissão para a coleta do material biológico de seu animal e a sua inclusão na pesquisa.

Como procedimento inicial foi realizada uma anamnese do animal, seguido por uma completa avaliação clínica. Os animais considerados aptos para cirurgia seguiram os seguintes critérios: valores hematológicos como eritrócitos $\geq 3.500.000 / \text{mm}^3$, leucócitos $\geq 6.000 / \text{mm}^3$, concentração sérica de creatinina $\leq 2 \text{ mg/dl}$ (Page, 1998).

Imediatamente após a realização da mastectomia e autorização formal do proprietário, foram coletadas amostras do tumor de aproximadamente 1cm^3 tanto para cultura celular quanto para posterior avaliação histopatológica.

4.2. EXAME ANATOMOPATOLÓGICO

Após a extração do tumor, o mesmo foi lavado com solução de PBS 0,1M e colocado em tubo de polipropileno (Falcon BD, USA) de 50 ml com a mesma solução. Em laboratório, no fluxo laminar, em ambiente estéril, o tumor foi analisado macroscopicamente quanto ao seu tamanho, levando em consideração a sua localização no animal.

Após a observação macroscópica o tumor foi separado em fragmentos, sendo um fragmento utilizado para realização do exame anatomopatológico e, o outro fragmento utilizado para cultura celular.

Para a realização do anatomopatológico, os fragmentos tumorais selecionados foram emblocados em parafina. Os blocos foram deixados 24 horas em um recipiente com água, em um ambiente com temperatura de 4°C e, sendo submetidos a cortes de $5 \mu\text{m}$ de espessura. Os fragmentos cortados foram deixados em estufa a 55 e 58°C por 24 horas.

Por último, a lâmina foi corada com hematoxilina e eosina para que as células tumorais pudessem ser caracterizadas histologicamente, utilizando a classificação desenvolvida por

(GOLDSCHMIDT et al., 2011), em que foram selecionados os carcinomas mamários simples, devido a sua maior casuística.

4.3. CULTIVO CELULAR

Após a retirada do tumor (mastectomia) as amostras que foram utilizadas para a cultura celular primária foram lavadas com PBS 0,1 M por três vezes. Após a lavagem foram colocadas na mesma solução (PBS 0,1M) em tubos de polipropileno (Falcon BD, USA) de 50 ml, com a adição de 0,5% de antibiótico próprio para uso em cultura celular (Sigma, composto por Penicilina 10.000 UI, Estreptomicina 10 mg/ml, e anfotericina B, 25 µg/ml). Para o transporte até o laboratório em que as amostras foram processadas, as mesmas foram acondicionadas em isopor acrescido de gelo.

No laboratório (LTIAM- Laboratório de Técnicas Imunológicas Aplicadas a Morfofisiologia - FMVZ USP) as amostras foram manuseadas em atmosfera estéril, em capela de fluxo laminar (Veco, Biosafe plus Classe II Tipo B3). Primeiramente os tumores foram retirados dos tubos e colocados em placas de Petri para serem dissecados, objetivando a retirada de todo o tecido gorduroso que recobria o tumor.

Seguindo o protocolo, o tumor foi dissociado em blocos de aproximadamente 0,01 cm², com um cabo de bisturi e uma lâmina número 23, bem como com uma tesoura de metzemba, lembrando que durante esse procedimento, o meio de cultura D-MEM High Glucose (Gibco, Brasil) foi adicionado aos poucos aos fragmentos tumorais, buscando preservar a viabilidade celular. Após a obtenção dos fragmentos tumorais, os mesmos foram colocados em garrafas de cultura de 25cm².

Quatro fragmentos tumorais foram colocados, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, em cada garrafa de cultura, sendo um em cada extremidade da garrafa. Após a colocação, os fragmentos receberam uma cobertura com soro fetal bovino (Invitrogen-USA) e, foram incubados em uma atmosfera de 5% de CO₂ com uma temperatura de 37°C durante 24 horas, sem adição de meio de cultura, buscando a fixação dos fragmentos ao fundo da garrafa. Após 24 horas as garrafas receberam 5ml de meio de cultura D-MEM High Glucose (Gibco- Brasil), acrescido de 10% de soro fetal bovino (Gibco-Brasil), 1 % de piruvato de sódio (Sigma-EUA), 2% de L-glutamina (Sigma-EUA) e 1% de antibiótico (Sigma-EUA).

As garrafas foram observadas diariamente e, após a confluência das células o explante foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Em seguida as células presentes na garrafa foram passadas para novas garrafas. Para isso, o meio de cultura presente nas

garrafas foi descartado e, foi adicionado tripsina a 0,25% (LGC Biotecnologia, Brasil) mantida durante 10 minutos em uma temperatura de 37° C com uma pressão de 5 % de CO₂. Após esse tempo a reação foi interrompida com a adição de 3 ml de meio de cultura D-MEM e as células foram postas em tubo de polipropileno (Falcon BD, USA) de 15 ml para serem centrifugadas durante 5 minutos em 700×g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 2 ml de D-MEM high glucose e colocadas em novas garrafas de cultura de 25 cm², mantidas em cultivo em uma temperatura de 37° C com uma pressão de 5% de CO₂.

As células foram então separadas em cinco grupos, com três repetições. A definição das concentrações dos reagentes e hormônios utilizados nos tratamentos abaixo foi estabelecida por diversos experimentos de curva –resposta para a expressão da IDO.

Grupo 1- Controle: células mantidas em cultivo (1×10^6), somente com D-MEM High Glucose, sem a adição de qualquer fator

Grupo 2- progesterona: as células (1×10^6) foram mantidas em cultivo por 24 horas após a adição de 25 Mm de progesterona (Sigma Aldrich, USA).

Grupo 3- 17 β estradiol: as células (1×10^6) foram mantidas em cultivo por 24 horas após a adição de 10 Mm de 17 β estradiol (Sigma Aldrich, USA).

Grupo 4- mifepristone + progesterona: uma hora após a adição do mifepristone (Sigma Aldrich, USA) (25 Mm) foi adicionado 5 μ g/ml de progesterona e as células (1×10^6) foram mantidas em cultivo por 24 horas.

Grupo 5- tamoxifeno + 17 β estradiol: uma hora após a adição do tamoxifeno (Sigma Aldrich, USA) (25 Mm) foi adicionado 5 μ g/ml de 17 β estradiol e as células (1×10^6) foram mantidas em cultivo por 24 horas.

As imagens das culturas celulares, nos diferentes tratamentos, foram verificadas em microscópio de luz invertida (Nikon Eclipse-TS 100) nos aumentos de 40x, 100x e 400x e fotografadas pelo sistema de captura (MTC Digital Color Câmera).

4.4. CITOMETRIA DE FLUXO

Pela citometria de fluxo foi mensurada a expressão da IDO e a identificação dos receptores de estrógeno e progesterona presente nas células do microambiente tumoral (células tumorais e leucócitos adjacentes).

Após os períodos dos respectivos tratamentos, as células foram centrifugadas a 700×g por cinco minutos e em seguida, as mesmas foram ressuspensas em PBS 0,1M e, uma concentração de 1×10^6 células foi adicionada por tubo. Antes da marcação com os respectivos anticorpos primários, as células foram permeabilizadas com Triton-X (Inlab, Brasil) 0,1% por 30 minutos e novamente lavadas.

O sobrenadante foi retirado e foram ressuspensas com PBS 0,1M, em que cada amostra foi incubada com 1 µl dos anticorpos primários anti-IDO (indoleamina 2,3 dioxigenase (Cód. EB 09548- Everest Biotech, USA), anti CD4 (cód. LSC88068-100- Lifespan, USA) e anti CD8 (cód. LSC82345-50- Lifespan, USA) por 30 minutos. Após esse período, as células foram lavadas com PBS 0,1M, o sobrenadante foi retirado e então, as mesmas foram ressuspensas com PBS 0,1M. Posteriormente foram incubadas com anticorpo secundário (Polyclonal Goat Anti-mouse IgG /FITC, Everest Biotech, USA); (mouse anti-rabbit IgG/PE, Everest Biotech, USA), por 30 minutos. Terminado este, as células foram novamente lavadas, ressuspensas em tampão FACS e analisadas em um citômetro de fluxo (FACS Calibur BD-Cytek, USA).

Controles para autofluorescência e marcação cruzada pelo anticorpo secundário foram realizados com grupos contendo somente células e grupos contendo somente células e o anticorpo secundário, respectivamente.

Foram respeitados os respectivos isotipos e as afinidades dos anticorpos, para evitar reações cruzadas e inespecíficas.

4.5. IMUNO-HISTOQUÍMICA

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 goat-anti IDO (Monoclonal: EB09548, Everest Biotech).

Os blocos de parafina foram cortados em uma espessura de 5µm e aderidos em lâminas previamente tratadas com o adesivo organosilano (Sigma, St. Louis, EUA, A3648), sendo mantidas 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 (820 Watts) (3x15 minutos) com as lâminas embebidas em tampão Citrato 10M, pH 6,0. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado em câmara escura com incubação do Kit Peroxidase Block 3% (Dako, N° DPB-125) durante 10 minutos em temperatura ambiente. A etapa seguinte foi a incubação do anticorpo primário na diluição proposta (overnight a 4° C em câmara úmida).

Posteriormente a incubação, as lâminas foram lavadas em PBS pH 7,4 e incubadas com anticorpo secundário biotinilado universal (15 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida). O sistema de detecção escolhido foi universal LSAB *plus* (Dako, 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 - 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, 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).

4.6. HEMATOXILINA E EOSINA (H.E.)

Após a mastectomia, o material foi lavado com PBS 0,1M e fixado em paraformaldeído 4% por um período de 48 horas. Iniciou-se, após as primeiras 48 horas, o protocolo de inclusão, em que o material foi deixado em álcool 70% overnight. Após esse período o fragmento tumoral foi submetido a uma série crescente de álcool: álcool 80% - 30minutos; álcool 90% - 30 minutos; álcool 100% - 30 minutos. Saindo da bateria de álcool o tecido foi posto em xilol I por 15 minutos e em xilol II por mais 15 minutos, sendo

colocado, após o xilol, em parafina I overnight. Em etapa final do protocolo de inclusão, o material foi submetido a parafina II (emblocado).

Os blocos de parafina foram cortados em uma espessura de 5µm e aderidos em lâminas para microscopia (Sigma, St. Louis, EUA, A3648), sendo mantidas em estufa a 60°C por 24 horas. A seguir, os cortes foram submetidos à desparafinização com dois banhos de xilol de 15 minutos cada um e posterior hidratação em álcool etílico absoluto em concentrações decrescentes (100% - 3 minutos; 95 % - 3 minutos; 70% - 3 minutos). Após a passagem pelo álcool a lâmina foi lavada em água corrente (3 minutos) e em seguida submetida à hematoxilina (2 minutos), sendo lavada novamente em água corrente (10 minutos). Seguindo o protocolo, o material foi posto em álcool-ácido e lavado em água corrente. Em sequência a lâmina foi posta na eosina (15 segundos), lavada em água corrente e colocada em álcool 95% - 2 minutos; álcool 100% - 2 minutos; álcool + xilol – 2 minutos; xilol I – 2 minutos; xilol II – 2 minutos, finalizando a coloração de H.E.

4.7. WESTERN BLOT

Com o uso desta técnica, a IDO foi quantificada nas células presentes no microambiente tumoral (células tumorais + leucócitos adjacentes), antes e após a adição dos respectivos tratamentos.

Após a identificação dos receptores hormonais pela citometria de fluxo, as células foram submetidas aos respectivos tratamentos por 24 horas. Após este período, foram separadas do restante da cultura para a extração de proteínas.

Iniciando o preparo das amostras, as mesmas foram homogeneizadas e submetidas à centrifugação (1600×g), objetivando a liberação dos ácidos nucleicos e proteínas localizadas no interior das células.

Em um tubo de polipropileno (Falcon BD, USA) de 15ml com o conteúdo celular, foi acrescentado uma solução tampão a base de fosfato de potássio. O conteúdo foi homogeneizado por 3 vezes durante 10 segundos, visando a ruptura das células. Após homogeneizadas as amostras foram mantidas em gelo e o material foi transferido para microtubos (Axygen, USA), que também foram mantidos no gelo. Em seguida, os microtubos (Axygen, USA) foram centrifugados por 20 minutos à 4°C / 700×g, removendo o material insolúvel.

Em etapa seguinte mensurou-se a concentração das proteínas totais presente nas amostras. Este procedimento foi realizado com o Kit Protein BCA Assay (Millipore, USA), em que a amostra foi comparada à uma curva já padronizada feita com albumina sérica bovina - BSA 2%. Posteriormente foi calculada a concentração de cada amostra ($\mu\text{g/ml}$).

Após o cálculo da concentração de proteína em cada amostra e a realização das diluições desejadas, foi preparado o gel de corrida utilizado para a realização da eletroforese. O gel utilizado foi o SDS-PAGE (Sodium Duodecil Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) na concentração de 10% e um tempo de transferência de 90 minutos.

Após o preparo do gel, as amostras foram preparadas para a corrida (Biorad-Bio 1740), em que foi separada uma alíquota de cada, deixando descongelar em um isopor com gelo. Após o descongelamento foi adicionado o tampão de amostra na concentração 1:1 e, as amostras foram aquecidas a 100°C por cinco minutos, visando a desnaturação das proteínas antes da corrida.

Em seguida, foi colocado 5 microlitros do marcador molecular no primeiro poço e as amostras foram colocadas nos seus respectivos poços. Então a corrida iniciou-se com 30V e, depois da passagem do gel de empacotamento, quando estava dentro do gel de separação, a voltagem foi elevada para 100V.

Após a corrida, foi iniciada a transferência das proteínas para a membrana, a fim de tornar as proteínas acessíveis à detecção do anticorpo. Estas foram movidas do gel para uma membrana de fluoreto de polivinileno (PVDF).

Após a transferência das proteínas para a membrana, foi feita uma solução de bloqueio com skim milk 10% (BD, USA) para evitar interações inespecíficas entre a membrana e o anticorpo utilizado para detectar a proteína alvo.

Após o bloqueio foi adicionado o anticorpo primário (indoleamina 2,3 dioxigenase) (EB-09548 Everest Biotech Ltd., UK). O mesmo foi incubado com a membrana sob uma leve agitação e mantido overnight a 4°C .

Após isso, a membrana foi lavada três vezes por períodos de cinco minutos com uma solução tampão (PBS 0.1M) e em seguida foi adicionado o anticorpo secundário (Rabbit anti-goatIgG /peroxidase- Invitrogen-Brasil) com 10 ml de solução tampão (PBS 0,1M) +0,1g de BSA. Após uma hora a membrana foi lavada 3 vezes por períodos de 10 minutos.

Após 3 lavagens de 5 minutos com solução tampão (PBS 0,1M) +0,1g de BSA), iniciou-se o processo de revelação, em que os sinais das marcações foram detectados pela adição de um substrato para peroxidase (ECL Western blotting analysis system, GE

Healthcare). As membranas foram analisadas no aparelho Bio-Rad ChemiDoc™ MP e no programa Image Lab 4.0.1 (BioRad).

4.8. PCR EM TEMPO REAL

Com a utilização do PCR foi mensurado a concentração de mRNA nas células presentes do microambiente tumoral para a síntese de IDO1, bem como a presença do gene para produção dos receptores de estrógeno e progesterona nas células do microambiente tumoral (células tumorais + leucócitos adjacentes). Para isso, foi utilizada a sequência genética responsável por carregar o código genético da proteína IDO e dos receptores hormonais propostos (PR, ER α , ER β), todos bem descritos na literatura.

Os primers para os genes em estudo foram obtidos de sequências caninas existentes no banco de dados NCBI. As reações foram desenvolvidas com a utilização do sistema TaqMan® (Life technologies, Foster, USA) e, o cálculo para apontar a eficiência dos genes alvo foi desenvolvido pelo programa “Lin Reg PCR” (Ramakers, Ruijter *et al.*, 2003).

Para a determinação da concentração e da qualidade do RNA foi usado o biofotometro BioPhotometer Thermo Scientific NanoDrop™ 2000c (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e a integridade foi analisada por electroforese através de gel de agarose 2%. As amostras (1 mg de RNA total) foram transcritas para cDNA (DNA complementar) com a utilização do Superscript III transcriptase reversa (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As reações de PCR foram realizadas utilizando um fluorômetro automatizado ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em que cada amostra (250 ng de RNA total) foi analisada em duplicata. Como controle interno das reações foi utilizado à amplificação do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

Gene	Primers	Sequência	Sondas	GenBank n° *
IDO1	Sense	5'TTCAGTGCTTTGACGTCCTG3'	AAGTCACGAAACTGCAGGAC	NC_006598.3
	Antisense			
RPL32	Sense	5'TGGAGGAACTGAGCAGCAT'3'	ATGTTGGCAGGATCTC - FAM	XM_854019.1
	Antisense			
PPIA	Sense	5'ACCAGCATCACCCCATTTG3'	CCTCCATGATGATGTCCTGACC	XM_843327.1
	Antisense	5'ACGGGAAGTCCATCTCCATCTT3'		
ESR1	Sense	5'ACACACGGAGCTACACGCAC3'	ATGTCCAGCC	NM_001002936.1
	Antisense			
ESR2	Sense	5'AGACCTCCCA3'	CGCCGTTCTC	XM_547920.2
	Antisense	5'AACCCAGGCC3'		
PGR	Sense	5' CCCAGCACGCCCTTTA3'	ATGTTGGCAGGATCTC - FAM	NM_001003074.1
	Antisense			

5. RESULTADOS

5.1. IMUNO-HISTOQUÍMICA

Figura 3: Em 1, 7 e 10, fotomicrografias do carcinoma túbulo papilífero grau II (Bar. 200 µm), identificando os túbulos mamários com a presença de células atípicas (setas). Em 2, 8 e 11, carcinoma túbulo papilífero grau II. Imunomarcção para IDO localizada nos túbulos mamários (setas). Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase contra corada por Hematoxilina de Harris. IHQ, Bar.200 µm. Em 4, carcinoma solido grau I, com

a presença de células atípicas e pleomorfismo celular. Em 5, carcinoma sólido. Observar nas células a presença de múltiplos grânulos intracitoplasmáticos (setas). Imunomarcação para IDO. Técnica estreptavidina-biotina peroxidase contra corada por Hematoxilina de Harris. Bar. 120 µm. Em 3, 6, 9 e 12, controles negativos.

Nos tumores 1, 3 e 4 nota-se a formação de túbulos distribuídos por todo o estroma tumoral, justificando a sua classificação tubular. A presença de células atípicas ao redor dos túbulos denota a característica necessária para a classificação em grau II. O tumor 2 não apresenta formações tubulares, sendo classificado como carcinoma sólido com células atípicas e grânulos intracitoplasmáticos.

Em todos os tumores analisados nota-se a presença da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase em marcação citoplasmática confinada, principalmente nas células epiteliais dos túbulos mamários (imagem 2, 8 e 11). Baseado na área e na intensidade de marcação, no tumor 1, 3 e 4, classificados como carcinoma túbulo papilífero grau II a marcação que justifica a expressão da IDO é consideravelmente mais significativa do que no tumor 2, identificado como um carcinoma sólido grau I (Figura 3).

5.2. Receptores de Estrógeno e Progesterona

Figura 4: gráficos referentes à expressão gênica (%) dos receptores de estrógeno (ER α e ER β) e progesterona presentes nas células do microambiente do carcinoma mamário de cadelas nos quatro tumores utilizados. Nos quatro tumores analisados a expressão de receptores de estrógeno β foi mais elevada que os receptores de estrógeno α , já os receptores de progesterona, identificados nos quatro microambientes, teve uma menor expressão no tumor 2.

Nota-se uma expressão mais elevada dos receptores de estrógeno beta em comparação ao estrógeno alfa nos quatro microambientes analisados (Figura 4). Os receptores de estrógeno alfa tiveram uma elevada expressão nos microambientes 2, 3 e 4,

excluindo o 1 em que se nota uma expressão de ER alfa menor quando comparada aos outros tumores. Os receptores de progesterona foram identificados nos quatro microambientes, sendo que no tumor 2 a expressão do respectivo receptor foi menor.

5.3. Curva dose-resposta (expressão de IDO)

A fim de se estabelecer as melhores concentrações dos hormônios e reagentes a serem utilizados nos tratamentos, bem como tempo de cultivo, diversos experimentos de curva dose-resposta para a expressão da IDO foram realizados (Figuras 5 – 10).

Controles

Figura 5: Exemplos de aquisições em dot plot evidenciando o controle do anticorpo secundário (anti goat-FITC-BluFL1) utilizado para a marcação da IDO nas células presentes no microambiente do carcinoma mamário de cadelas. Em A seleção da população a ser analisada (gate); em B presença de um histograma evidenciando a não reação cruzada do anticorpo secundário com as células do respectivo microambiente; em C histograma mostrando a viabilidade celular.

Figura 6: Exemplos de aquisições em dot plot. Desenvolvimento da curva dose resposta referente à expressão da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase presente nas células do microambiente do carcinoma mamário de cadelas após a suplementação com as diferentes dosagens (10 μ M; 25 μ M; 50 μ M) dos referidos compostos (estrógeno; progesterona; tamoxifeno; mifepristone).

Figura 7: Gráficos ilustrando a curva dose resposta da expressão da IDO (%) nas células do microambiente do carcinoma mamário de cadelas submetidas à diferentes doses dos respectivos tratamentos. Nos gráficos nota-se a expressão de IDO nas células presentes no microambiente do carcinoma mamário de cadelas submetidas aos diferentes tratamentos: 1 (estrógeno); 2 (progesterona); 3 (tamoxifeno); 4 (mifepristone), nas diferentes dosagens (10 μM ; 25 μM ; 50 μM).

Para o desenvolvimento da curva dose resposta foram realizadas três repetições experimentais. Após a digestão tumoral, as células foram cultivadas (microplacas de 24 poços) e, após 24 horas, os suplementos foram adicionados. Mediante a presença do estrógeno, observou-se uma maior expressão de IDO na dose de 10 μM , enquanto, na presença dos demais compostos (progesterona, tamoxifeno e mifepristone) a maior expressão da enzima foi verificada na dose de 25 μM .

5.4. Expressão da IDO x tempo de cultivo

Figura 8: Exemplos de aquisições em dot plot evidenciando o controle do anticorpo secundário (anti goat-FITC-BluFL1) utilizado para a marcação da IDO nas células presentes no microambiente do carcinoma mamário de cadelas. Em A seleção da população a ser analisada (gate); em B presença de um histograma evidenciando a não reação cruzada do anticorpo secundário com as células do respectivo microambiente; em C histograma mostrando a viabilidade celular.

Figura 9: exemplos de aquisições em histograma. Verificação da expressão de IDO nas células presentes no microambiente do carcinoma mamário de cadelas nos diferentes tempos propostos (2h; 6h; 12h; 24h)

EXPRESSÃO DE IDO x TEMPO

Figura 10: Expressão da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase- IDO (%) nas células do microambiente do carcinoma mamário de cadelas em cultivo nos diferentes tempos propostos.

Inicialmente, antes da verificação da expressão de IDO, foi feita a mensuração da viabilidade celular, em que foram selecionadas as culturas com uma viabilidade superior a 75%. Com a análise das células do microambiente tumoral para a expressão de IDO nos tempos propostos, notou-se uma maior expressão da enzima 24 horas após o início do cultivo.

5.5. WESTERN BLOT

Figura 11: Imagem das marcações de IDO utilizadas para quantificação (n=5) (47 Kd) pela técnica de western blot, seguida por imagens da mesma membrana mostrando o controle endógeno (B-Actina -50 Kd).

Figura 12: Quantificação da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (%) presente nas células do microambiente tumoral (n=4) 24 horas após a suplementação com E2 (estrógeno) P4 (progesterona); Mife. (mifepristone); Tamox. (tamoxifeno). A significância estatística baseia-se nos efeitos provocados pela adição dos compostos (progesterona e estrógeno) nas células tumorais, bem como nos efeitos provocados pela adição dos bloqueadores dos receptores hormonais (tamoxifeno e mifepristone) sobre as células estimuladas com estrógeno e progesterona. Dados apresentam as médias $\pm$ desvio padrão da expressão relativa da proteína. (n=12 [3 repetições]) **p<0.01; *p<0.05.

Frente a técnica de Western blot (Figura 9), em que houve um aumento na expressão da enzima na presença de progesterona (Figura 10-C) em todos os tumores analisados. Após a adição do estrógeno (Figura 10-B), houve uma elevação na expressão de IDO nos quatro microambientes estudados. Os efeitos do mifepristone (Figura 10-D) foram mais evidentes nos tumores 1 e 4, em que causaram uma elevação da enzima quando comparado com os efeitos da progesterona (Figura 10-C). Nos tumores 2 e 3 ocorreu o mesmo efeito frente à adição do mifepristone (Figura 10-D) (elevação na expressão da IDO), no entanto com menor significância estatística. Já o tamoxifeno provocou uma diminuição na expressão de IDO nos tumores 2, 3 e 4 quando comparado a elevação da expressão da enzima provocada pelo estrógeno (Figura 10-B). No tumor 1 o tamoxifeno provocou diminuição na expressão de IDO, porém, com uma menor significância estatística.

5.6. Real Time - PCR

Figura 13: Expressão gênica da indoleamina 2,3 dioxygenase (IDO) (RGE) em células do microambiente dos 4 carcinomas mamários de cadelas analisados, 24 horas após a adição dos respectivos tratamentos: SC (sem tratamento), E2 (estrógeno), P4 (progesterona), Mife. (mifepristone) e Tamox (tamoxifeno). Dados apresentam as médias $\pm$ desvio padrão da expressão relativa dos genes (n=12 [3 repetições]) **p<0.01; p<0.05

A análise da expressão gênica da IDO (Figura 11) após a adição de estrógeno (B) permitiu que observássemos uma elevação na expressão da enzima quando comparada ao SC (A) nos tumores 1, 2 e 3, com maior significância no tumor 3. Já no tumor 4 o estrógeno, apesar de elevar a expressão de IDO, não foi tão estatisticamente significativo quanto aos demais tumores.

Frente a adição de progesterona (C) os quatro tumores analisados sofreram alterações na expressão gênica. O tumor 1, 2 e 4 sofreram uma leve diminuição do respectivo gene

estudado, enquanto no tumor 3 a progesterona (C) provocou uma elevação na expressão gênica da IDO.

Referente à adição do mifepristone (D) todos os tumores mostram uma elevação na expressão gênica quando comparados a mesma expressão após a adição de progesterona (C). Os tumores 1 e 2 mostram uma alteração estatisticamente significativa quando comparados aos tumores 3 e 4.

Após a adição do tamoxifeno (E) verificou-se uma diminuição na expressão gênica nos tumores 1, 2 e 3 com uma significância estatística. Já no tumor 4 o respectivo composto, apesar de causar uma diminuição na expressão gênica da IDO quando comparado à suplementação com o estrógeno (B), não mostrou uma significância estatística.

5.7. Citometria de fluxo

Figura 14: Controles utilizados nas análises feitas pela citometria de fluxo. Em A, gate com a população selecionada a ser analisada; em B controle negativo para o Fitc –blu-fl1; em C controle negativo para o PE-red-fl3; em D marcação das células viáveis em Viol-fl1.

Figura 15: Análise das células presentes no microambiente tumoral. Exemplos de aquisições em dot plot. No gráfico 1 realizou-se a seleção da população a ser analisada (gate); a partir da população pré-selecionada no gráfico 1, selecionou-se a população positiva marcada com os devidos anticorpos primários para identificar os linfócitos (2); no gráfico 3 foi feito um histograma identificando a população leucocitária IDO-positiva.

SEM TRATAMENTO

TAMOXIFENO

Figura 16: Valores percentuais da expressão da IDO frente aos diversos tratamentos obtidos pela citometria de fluxo nos quatro grupos estudados. (n=4 [3 repetições]). Dados apresentam as médias $\pm$ desvio padrão da expressão relativa da IDO (**p<0.01; *p<0.05).

No tumor 1 e 4, de acordo com os dados estatísticos (Figura 14), houve um aumento na expressão de IDO pelas células CD4, CD8 e pelas células dendríticas submetidas à suplementação com estrógeno. Já no tumor 2 (Figura 14) somente as células CD4 e CD8 sofreram este aumento. No tumor 3 o estrógeno exerceu influência (aumento) sobre a expressão de IDO nas células dendríticas e nas células CD4.

Após a suplementação com progesterona, as células CD4 apresentaram uma discreta diminuição na expressão da enzima, enquanto as células CD8 e as células dendríticas do tumor 1 mantiveram os níveis de IDO. Nos demais tumores (2, 3 e 4) a expressão da IDO não foi alterada em nenhuma das células analisadas após a adição de progesterona.

Na presença do mifepristone (inibidor dos receptores de progesterona) observou-se um aumento da enzima nas células CD4 no tumor 1 e 4 e nas células CD8 no tumor 1 e 2. As células dendríticas mantiveram os níveis de IDO nos tumores 1, 2 e 4, causando uma pequena elevação da expressão da enzima no tumor 3.

Com a adição do tamoxifeno foi verificado uma diminuição da IDO em todos os tipos celulares em todos os tumores, principalmente quando comparado à suplementação com estrógeno, exceto no tumor 2 nas células dendríticas, em que, perante ao estrógeno o tamoxifeno não exerceu efeito, no entanto quando compara-se o tamoxifeno com o SC nota-se uma significativa diminuição na expressão da enzima

6. DISCUSSÃO

A investigação sobre os efeitos dos hormônios esteroides na alteração da expressão de IDO (progesterona e estrógeno) nas células do microambiente tumoral, mostraram a interferência de ambos, onde a progesterona induz à uma discreta diminuição e o estrógeno eleva a concentração da mesma. Tais achados foram confirmados com o bloqueio dos receptores hormonais, que também ocasionaram alterações na expressão da enzima, indicando que a via de estimulação da IDO envolve a participação dos receptores de progesterona e estrógeno.

Na presença de progesterona, as células do microambiente tumoral diminuíram a expressão de IDO, fato encontrado em outros microambientes, como na interface materno-fetal (BIANCHI et al., 2017). No entanto, a progesterona não levou à uma completa interrupção da expressão da mesma, evidenciando a participação do hormônio sobre um mecanismo para a manutenção dos níveis basais da enzima. Sugere-se que o mecanismo pelo qual a progesterona atua na diminuição da expressão da IDO é desencadeado pela estimulação da produção de citocinas com perfil anti-inflamatório pelos linfócitos Th2 (BARRERA, AVILA, DÍAS, 2007), principalmente a IL-4 e o TGF- β . Tais citocinas não exercem um efeito direto sob a expressão da enzima, porém com a inibição da produção de fatores pró-inflamatórios pelos linfócitos (KYURKCHIEV et al., 2010) pode ser que haja a diminuição da estimulação à expressão de IDO, já que a mesma é fortemente estimulada por citocinas pró-inflamatórias.

O efeito da progesterona nas células dendríticas e nos linfócitos TCD4 altera a expressão de IDO (BIANCHI et al., 2017). Um mecanismo proposto para a atividade da progesterona na expressão da IDO em DCs e células T CD4 + pode ser justificado pela ligação do hormônio com o seu receptor, criando um complexo hormônio-receptor que se liga ao DNA dos linfócitos induzindo a produção do fator bloqueador conhecido como PIBF. Este bloquearia a ação da fosfolipase A2, inibindo a liberação do ácido araquidônico, levando à redução da síntese das prostaglandinas, prevenindo assim a produção de citocinas pró-inflamatórias, (BARTHO, WEGMANN, 1996; PAPAMITSOU et al., 2011) incluindo IFN- γ , o principal indutor da expressão de IDO.

A progesterona também é capaz de estimular DCs imaturas ao seu completo amadurecimento e posterior ativação dos linfócitos, induzindo a sua diferenciação de Th0 para células Th1 ou Th2, dependendo do contexto. Na resposta aos antígenos tumorais, ocorre a prevalência do perfil Th1, com a produção de citocinas pró-inflamatórias,

especialmente IFN- γ (SPAGGIARI et al., 2009). Por conseguinte, embora a progesterona atenua a expressão de IDO, sugerimos que indiretamente, pela ação do IFN- γ derivado dos linfócitos Th1, a progesterona não cessaria completamente a expressão da enzima, assegurando a presença de IDO no controle da inflamação (MBONGUE et al., 2015; HUANG et al., 2010; HARDEN et al., 2012), agindo como um mecanismo de regulação bastante efetivo, pois impede uma resposta inflamatória exacerbada devido à sua ação sobre a estimulação da IDO pelas próprias células inflamatórias.

Mediante a adição do estrógeno observou-se uma elevação na expressão de IDO, fato que poderia estar relacionado à ação do hormônio nas células tumorais e nas células imunológicas localizadas ao redor do tumor (XIAO, LIU, LINK, 2004). Este desencadearia seus efeito pela ligação com seus receptores específicos (ER α e ER β) (SIRACUSA et al., 2008), induzindo a uma mudança no perfil imunológico e favorecendo a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o IFN- γ .

Uma relação de interdependência entre a IDO e o estrógeno é bastante evidente ao considerar a ligação da quinurenina, principal catabólito oriundo da quebra do triptofano pela IDO, ao seu receptor específico (AHR), capaz de estimular genes ligados a esteroidogênese, conhecidos por elevar a produção de estrógeno (CyP1A1, CyP1A2, CyP1B1) (BEKKI et al., 2015), sugerindo que, mediante a ação da IDO, ocorre uma elevação na produção de estrógeno.

Considerando o ambiente tumoral, onde existe uma reação inflamatória intensa (MANTOVANI, 2010), tal relação (IDO-Estrógeno) torna-se fundamental para o desenvolvimento do tumor, já que as células tumorais necessitam escapar do sistema imunológico para sua sobrevivência. Com a estimulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente o IFN- γ , pelo estrógeno (STRAUB, 2007), teoricamente iria existir um combate às células tumorais, o que é prejudicado devido a presença da IDO, que se beneficia com as citocinas pró-inflamatórias e, ainda, continua estimulando a produção do estrógeno de uma maneira indireta, pela ligação da quinurenina ao seu receptor específico AHR (GO, HWANG, CHOI, 2015).

A melatonina, conhecida por inibir a produção de estrógeno, também pode participar da relação IDO-estrógeno. Com a ação da IDO sob o triptofano ocorre uma diminuição na produção de melatonina, pois a mesma necessita deste aminoácido para ser produzida (HILL et al., 2015), elevando, conseqüentemente, a produção de estrógeno. Então, quanto maior é a concentração de IDO, maior será a produção de estrógeno, indicando um mecanismo de inter-relação entre a IDO-melatonina-estrógeno.

Um mecanismo de ação desencadeado pelo estrógeno que pode estar relacionado com a elevação da expressão de IDO, é a sua relação com o fator de transcrição nuclear NF- κ B (DAI et al., 2013). Após a estimulação do estrógeno o NF κ B se transloca para o núcleo celular, estimulando a expressão de genes relacionados a inflamação, com consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IFN- γ) (KALAITZIDIS; GILMORE, 2005), podendo elevar a expressão de IDO. No entanto, a IL-6 é conhecida por causar uma degradação proteossomal da IDO (PALLOTA et al., 2010), um fato contraditório já que o estrógeno eleva a expressão de IDO conforme os nossos achados. Sugere-se que a degradação da IDO pela IL-6 sirva como um mecanismo de controle para que não haja uma super expressão da enzima, protegendo as células tumorais da falta do triptofano.

No carcinoma mamário a elevação da expressão de IDO frente ao estrógeno, pode também ser correlacionada com a insulina. Para que o estrógeno possa agir é necessário a presença de insulina para a ativação de receptores estrogênicos (LI et al., 2017). Com tais informações, é possível inferir que a expressão de IDO via estrógeno é dependente da insulina, sugerindo-se uma ação indireta da mesma (insulina) sobre a expressão de IDO (WOODGETT et al., 2003)

Foi verificado, frente a adição do estrógeno uma elevação na expressão de IDO nos linfócitos TCD8. Um mecanismo proposto para tal é a ação dos LTCD8 como células com perfil imunomodulador (CHEN et al., 2013). Os linfócitos TCD8 são capazes de secretar uma gama de citocinas e expressarem moléculas de adesão após um estímulo, provocado, neste caso, pelos próprios antígenos tumorais. Após a secreção do IFN- γ pelos linfócitos TCD8 ativados, as células dendríticas presentes em determinado microambiente (tumoral) podem entrar em um estado tolerogênico devido à elevação na expressão de IDO provocada pela citocina pró inflamatório secretada pelo LTCD8 (IFN- γ). A ação da IDO nesse microambiente pode inibir a ação dos linfócitos TCD4 e, consequentemente, impedir a continuidade da resposta imunológica contra as células tumorais, favorecendo o desenvolvimento do tumor. Indo de encontro com os nossos achados, o estrógeno provoca a elevação na expressão de IDO pelos linfócitos TCD8, pois os mesmos possuem receptores para tal hormônio, sendo capaz de estimular a secreção de IFN- γ e, indiretamente provocar a sua própria inibição pelo estímulo a moléculas inibitórias.

Um fato importante é que as células dendríticas estimuladas pelo IFN- γ oriundo dos linfócitos TCD8 passam a expressar TGF- β , uma importante molécula capaz de estimular a

expressão de IDO por outra via, uma via não inflamatória, explicando a diminuição da expressão de IDO frente ao inibidor de estrógeno, mas não a completa interrupção da mesma.

Com a adição do inibidor dos receptores estrogênicos ($ER\alpha$ e $ER\beta$), o tamoxifeno, a expressão de IDO foi diminuída, porém não totalmente extinta. Sugere-se que a IDO possua outras vias de estimulação, como pelo TGF- β , uma citocina anti-inflamatória conhecida pelos seus efeitos de estimulação à proteína FYC (YOSHIMURA, WAKABAYASHI, MORI, 2010), à qual se liga aos seus receptores na molécula de IDO (ITIMS). Após tal ligação, as receptores da enzima tornam-se ativos e, as proteínas SHP-1/2 irão se ligar nos mesmos estimulando a via não canônica do NF- $\kappa\beta$ (MELLOR; MUNN, 2014). Sugere-se que com a via não clássica em atividade, o estímulo à produção do TGF- β é progressivo, mantendo a expressão de IDO.

O mecanismo de escape imunológico deve ser muito bem orquestrado, controlando os agentes capazes de causar danos às células tumorais. A IDO, apesar de ser de extrema importância para a progressão do tumor, encontra-se em um equilíbrio, evitando que sua ação não cause danos colaterais ao desenvolvimento tumoral, considerando que a ausência total de triptofano seria danosa às células tumorais. Por isso, o tumor contaria com mecanismos capazes de controlar a ação da IDO, como é o caso da IL-6 que, apesar de ser uma citocina pró-inflamatória, induz à uma degradação proteossomal da enzima.

Com o entendimento da relação entre os hormônios esteroides e a expressão da enzima (IDO), poderemos aprofundar os estudos relacionados aos mecanismos de ativação e inibição da expressão de IDO, buscando intervir geneticamente, em passos futuros, bloqueando os genes relacionados à produção de estrógeno e progesterona e mensurando a expressão de IDO, obtendo, de maneira sólida, a existência de uma relação entre a expressão de IDO em ambientes de tolerância imunológica, com os hormônios esteroides propostos.

7. Conclusões

- A expressão da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase sofre influência dos hormônios esteroides estudados.
- Mediante à presença do estrógeno a expressão da IDO e do seu mRNA é elevada.
- Com a adição de progesterona a expressão de IDO e do seu mRNA sofre uma leve diminuição.

- Na presença do bloqueador dos receptores estrogênicos (tamoxifeno) a expressão de IDO e do seu mRNA é diminuída.
- Com a adição do bloqueador de progesterona (mifepristone) a expressão de IDO e do seu mRNA foi elevada.

8. REFERÊNCIAS

ANNADORA, J.; BRUCE-KELLER, J.; KEELING, J. N.; KELLER, F. F.; HUANG, S. C.; MARK, P. M. Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. **Endocrinology**, v. 141, p. 46–56, 2000.

ANNALISA, D. P.; SCHIOPPA, T.; TIBERIO, L.; STABILE, H.; SOZZANI, S. Leukocyte trafficking in tumor microenvironment. **Current opinion in Pharmacology**, v. 35, p. 40–47, 2017.

ANDREW, L. M.; DAVID, H. M. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? **Immunology Today**, v. 20, p. 469–473, 2013.

ARCK, P.; HANSEN, P. J.; MULAC JERICEVIC, B.; PICCINNI, M. P.; SZEKERES-BARTHO, J. Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. **American journal of reproductive immunology**, v. 58, p. 268–79, 2007.

ARIAS PULIDO, H.; CHAHER, N.; GONG, Y.; QUALLS, C.; VARGAS, J.; ROYCE, M. Tumor stromal vascular endothelial growth factor A is predictive of poor outcome in inflammatory breast cancer. **BMC Cancer**, v. 12, p. 298–304, 2012.

ASGHAR, K.; FAROOQ, A.; ZULFIQAR, B.; RASHID, M. U. Indoleamine 2,3-dioxygenase: As a potential prognostic marker and immunotherapeutic target for hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 23, p. 2286–2293, 2017.

AUGEREAU, P.; PATSOURIS, A.; BOURBOULOUX, E.; GOURMELON, C.; ABADIE LACOURTOISIE, S.; BERTON, R. D. Hormonoresistance in advanced breast cancer: a new revolution in endocrine therapy. **Ther Adv Med Oncol**, v. 14, n.9, p. 335–46, 2017.

BABAN, B.; CHANDLER, P. R.; SHARMA, M. D.; PIHKALA, J.; KONI, P. A.; MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells. **Journal of immunology**, v. 183, p. 2475–83, 2009.

BACHELERIE, F.; BEN-BARUCH, A.; BURKHARDT, A. M.; COMBADIÈRE, C.; FARBER, J. M.; GRAHAM, G. J.; HORUK, R.; SPARRE-ULRICH, A. H.; LOCATI, M.; LUSTER, A. D. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. **Pharmacol**, v. 66, p. 1–79, 2014.

BARRERA, D.; ÁVILA, E.; DÍAS, L. Papel Inmunológico de La Progesterone em El Mantenimiento Del Embarazo. **Revista de Investigación Clínica**, v. 59, p. 139–145, 2007.

BARTHO, J. S.; WEGMANN, T. G. A Progesterone-Dependent immunomodulatory Protein Alters the Th1/Th2 balance. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 31, p. 81–95, 1996.

BASSAL, N. K.; HUGHES, B. P.; COSTABILE, M. Arachidonic acid and its COX1/2 metabolites inhibit interferon- γ mediated induction of indoleamine-2,3 dioxygenase in THP-

1 cells and human monocytes. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 87, p. 119–26, 2012.

BEKKI, K.; VOGEL, H.; LI, W.; ITO, T.; SWEENEY, C.; HAARMANN-STEMMANN, T.; VOGEL, C. F. A. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediates resistance to apoptosis induced in breast cancer cells. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 120, p. 5–13, 2015.

BIANCHI, P. K. F. C.; LEANDRO, R. M.; POSCAI, A. N.; YOSHINAGA, T.; GANÇALEZ, P. O.; KFOURY, J. R. Progesterone Decreases in vitro Indoleamine 2, 3-dioxygenase Expression in Dendritic and CD4+ Cells from Maternal-Fetal Interface of Rats. **Immunological Investigations**, v.46, p.1-13, 2017.

BOTELHO, M. C.; ALVES, H.; BARROS, A.; RINALDI, G.; BRINDLEY, P. J.; SOUSA, M. The role of estrogens and estrogen receptor signaling pathways in cancer and infertility: The case of schistosomes. **Trends in Parasitology**, v. 31, p. 246–250, 2015.

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.

BOWERS, W.L.; CAVAZOS, D.A.; MAXIMO, I.X.F.; BRENNER, A.J.; HURSTING, D.S.; GRAFFENRIED, L.A. Obesity enhances nongenomic estrogen receptor crosstalk with the PI3K/Akt and MAPK pathways to promote in vitro measures of breast cancer progression. **Breast Cancer Research**, v.15, P. 2-13, 2013.

BRUCE-KELLER, A. J.; KEELING, J. L.; KELLER, J. N.; HUANG, F. F.; CAMONDOLA, S.; MATTSON, M. P. Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. **Endocrinology**, v. 141, p. 3646–56, 2000.

BUTTS, C. L.; CANDANDO, K.M.; WARFEL, J.; BELYAVSKAYA, E.; AGNILLO, F.; STERNBERG, E.M. Progesterone regulation of uterine dendritic cell function in rodents is dependent on the stage of estrous cycle. **Mucosal immunology**, v. 3, p. 496–505, 2010.

CAMPIA, I.; BUONDONNO, I.; CASTELLA, B.; ROLANDO, B.; KOPECKA, J.; GAZZANO, E. Autocrine Cytokine/JAK/STAT-Signaling Induces Kynurenine Synthesis in Multidrug Resistant Human Cancer Cells, **PLoS ONE**, v. 10, p. 126-159, 2015.

CARVALHO, M. I.; PIRES, I.; PRADA, J.; QUEIROGA, F. L. A role for T-lymphocytes in human breast cancer and in canine mammary tumors. **BioMed Research International**, v. 8, p. 132-145, 2014.

CASEY, S.C.; LI, Y.; FAN, A.C.; FELSHER, D.W. Oncogene withdrawal engages the immune system to induce sustained cancer regression. **J. Immunother Cancer**, v. 2, p. 1-13, 2014.

CHEN, J.; YAO, Y.; GONG, C.; YU, F.; SU, S.; CHEN, J.; LIU, B.; DENG, H.; WANG, F.; LIN, L. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3. **Cancer cell**, v. 19, p. 541-555, 2011.

CHEN, W. News and views IDO: more than an enzyme. **Nature**, v.12, p. 809–811, 2013.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Patologia estrutural e funcional. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1400p.

DAI, R.; PHILLIPS, R.A.; KARPUZOGLU, E.; AHMED, S.A.; KHAN, D. Estrogen Regulates Transcription Factors STAT-1 and NF- κ B to Promote Inducible Nitric Oxide Synthase and Inflammatory Responses. **Journal Immunology**, v. 183, p.6998-7005, 2009.

DANIEL, A. R.; KNUTSON, T. P.; LANGE, C. A. Signaling inputs to progesterone receptor gene regulation and promoter selectivity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.308, p. 47–52, 2009.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHERI, S.M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C. H. Prevalencia 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.

DENG, C.; BRODIE, S. G. Knockout mouse models and mammary tumorigenesis. **Cancer Biol**, v. 11, p. 387-394, 2001.

DERYNCK, R.; AKHURST, R. J.; BALMAIN, A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. **Nat Genetic**, v. 29, p. 117-29, 2001.

DIAS PEREIRA, P.; LOPES, C. C.; MATOS, A. J.; SANTOS, M.; GARTNER, F.; MEDEIROS, R.; LOPES, C. COX-2 expression in canine normal and neoplastic mammary gland. **J. Comp. Pathol**, v. 8, p. 89-93, 2009.

DRUCKMANN, R.; DRUCKMANN, M. A. Progesterone and the immunology of pregnancy. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 97, p. 389–96, 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.; PUCCETTI, 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.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat. Med**, v. 9, p. 669–76, 2003.

GO, R. E.; HWANG, K. A.; CHOI, K. C. Cytochrome P450 1 family and cancers. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 147, p. 24–30, 2015.

GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.48, p.117-131, 2011.

GROUX, H.; BIGLER, M.; VRIES, J. E.; RONCAROLO, M. G. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. **The Journal of Immunology**, v. 160, p. 188-93, 1998.

GRUGAN, K. D.; MCCABE, F. L.; KINDER, M.; GREENPLATE, A. R.; HARMAN, B. C.; EKERT, J. E. Tumor-associated macrophages promote invasion while retaining Fc-dependent anti-tumor function. **The Journal of Immunology**, v. 189, p. 54-57, 2012.

HANAHAN, D. WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646–74, 2011.

HANUKOGLU, I. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v. 43, p. 779–804, 1992.

HARDEN, J. L.; EGILMEZ, N. K. Indoleamine 2,3-dioxygenase and dendritic cell tolerogenicity. ***Immunological Investigations***, v.41, p. 738-764, 2012.

HARRISON, M. L.; OBERMUELLER, E.; MAISEY, N. R.; HOARE, S.; EDMONDS, K.; LI, N. F.; CHAO, D.; HALL, K.; LEE, C.; TIMOTHEADOU, E.; CHARLES, K.; AHERN, R.; KING, D. M.; EISEN, T.; CORRINGHAM, R.; DEWITTE, M.; BALKWILL, F.; GORE, M. Tumor Necrosis Factor α As a New Target for Renal Cell Carcinoma: two Sequential Phase II Trials of Infliximab at Standard and High Dose *J. Clin. Oncol*, v. 25, p. 4542-4549, 2007.

HE, R.; YANG, X.; SHI, Y. H.; LI, B.; LIU, W.; YIN, W. FAP promotes immunosuppression by cancer associated fibroblasts in the tumor microenvironment via STAT3-CCL2 signaling. **Cancer research**, v. 15, p. 29-73, 2016.

HILL, S. M.; BELANCIO, V. P.; DAUCHY, R. T.; XIANG, S.; BRIMER, S.; MAO, L.; BLASK, D. E. Melatonin: An inhibitor of breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 22, p. 112-117, 2015.

HOLT, D. M.; MA, X.; KUNDU, N.; COLLIN, P. D.; FULTON, A. M. Modulation of host natural killer cell functions in breast cancer via prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4. **J Immunother**, v. 35, p. 179-88, 2012.

HUANG, L.; BABAN, B.; JOHNSON, B. A.; MELLOR, A. L. Dendritic cells, indoleamine 2,3 dioxygenase and acquired immune privilege. ***International Reviews Immunology***, v. 2, p. 133-155, 2010.

IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; BHATTACHARJEE, J.; REALACCI, M.; DI VITO, M.; FERRETTI, C.; PAULESU, L. 17- β Estradiol modulates the macrophage migration inhibitory factor secretory pathway by regulating ABCA1 expression in human first-trimester placenta. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, v. 298, p. 411–8, 2010.

INGVARSSON, S. Breast cancer: introduction. **Cancer Biol**, v. 11, p. 323-326, 2001.

ISLA LARRAIN, M. T.; RABASSA, M. E.; LACUNZA, E.; BARBERA, A.; CRETÓN, A.; SEGAL EIRAS, A. IDO is highly expressed in breast cancer and breast cancer-derived circulating microvesicles and associated to aggressive types of tumors by in silico analysis. **Tumour Biol**, v. 35, p. 6511-6519, 2014.

JACQUEMIER, J.; FINETTI, P.; ESTERNI, B.; CHARAFE JAUFFRET, E.; THIBULT, M.; HOUVENAEGHEL, G. 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 cancer**, v. 104, p. 96–104, 2012.

JANAKIRAM, M.; ABADI, Y. M.; SPARANO, J. A.; ZANG, X. T cell coinhibition and immunotherapy in human breast cancer. **Discovery medicine**, v. 14, p. 229, 2012.

Jl, Y.N.; WANG, Q.; LI, Y.; WANG, Z. Prognostic value of vascular endothelial growth factor A expression in gastric cancer: a meta-analysis. **Tumour Biology**, v. 35, p. 2787–9, 2014.

JUHÁSZ, C.; NAHLEH, Z.; ZITRON, I.; CHUGANI, D. C.; JANABI, M. Z.; BANDYOPADHYAY, S.; MUZIK, O. Tryptophan metabolism in breast cancers: molecular imaging and immunohistochemistry studies. **Nuclear medicine and biology**, v. 13, p. 1–7, 2012.

KANEKO, K.; ISHIGAMI, S.; KIJIMA, Y.; FUNASAKO, Y.; HIRATA, M.; OKUMURA, H. Clinical implication of HLA class I expression in breast cancer. **BMC Câncer**, v. 11, p. 1-6, 2011.

KALAITZIDIS, D.; GILMORE, T. D. Transcription factor cross-talk: The estrogen receptor and NF- κ B. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 16, p. 46–52, 2005.

KENNY, P. A.; LEE, G. Y.; BISSELL, M.J. Targeting the tumor microenvironment. **Front Biosci**, v. 12, p. 3468–74, 2007.

KUDO, Y.; BOYD, C. A. R.; SPYROPOULOU, I.; REDMAN, C. W. G.; TAKIKAWA, O.; KATSUKI, T.; SARGENT, I. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase: distribution and function in the developing human placenta. **Journal of reproductive immunology**, v. 61, p. 87–98, 2004.

KUDO, Y.; HARA, T.; KATSUKI, T.; TOYOFUKU, A.; KATSURA, Y.; TAKIKAWA, O.; OHAMA, K. Mechanisms regulating the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase during decidualization of human endometrium. **Human reproduction**, v. 19, p. 1222–30, 2004.

KUOL, N.; STOJANOVSKA, L.; NURGALI, K.; APOSTOLOPOULOS, V. The mechanisms tumor cells utilize to evade the host's immune system. **J. Maturitas**, v. 4, p. 1-14, 2017.

KYURKCHIEV, D.; IVANOVA TODOROVA, E.; KYURKCHIEV, S. D. New target cells of the immunomodulatory effects of progesterone. **Reproductive BioMedicine**, v. 21, p. 304–311, 2010.

LANDSKRON, G.; DE LA FUENTE, M.; THUWAJIT, P.; THUWAJIT, C.; HERMOSO, M. A. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. **Journal of immunology research**, v. 14, p. 91-85, 2014.

LEANDRO, R. M. Expressão da enzima Indoleamina-2,3-dioxigenase em neoplasias mamárias de cães. 94 f. Tese - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2014.

LEVANO, K. S.; JUNG, E. H.; KENNY, P. A. Breast cancer subtypes express distinct receptor repertoires for tumorassociated macrophage derived cytokines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 411, p. 107-10, 2011.

LEI, N.; WANG, Y.; ZHANG, W. J.; DUAN, J. Z.; YANG, G. B. Indoleamine 2,3-dioxygenase is differentially expressed by different white blood cell populations of rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **Journal of medical primatology**, v. 42, p. 192–203, 2013.

LI, Z. H.; XIONG, Q. Y.; XU, L.; DUAN, P.; YANG, Q. O.; ZHOU, P.; HONG, J. MiR-29a regulated ER-positive breast cancer cell growth and invasion and is involved in the insulin signaling pathway. **Oncotarget**, vol. 8, p. 32566-32575, 2017.

LIANG, J.; SUN, L.; WANG, Q.; HOU, Y. Progesterone regulates mouse dendritic cells differentiation and maturation. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 830–838, 2006.

LINGWOOD, D.; SIMONS, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. **Science**, v. 327, p. 46–50, 2010.

LOURO, I. D. Oncogenética. **Revista Soc. Bras. Câncer**, v. 11, p. 36-42, 2000.

MACLACHALAN, N. J.; KENNEDY, P. C. Tumors of the genital systems, p. 547-573, 2002. In: Meuten D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 4th ed. Iowa State Press, Ames.

MAEDA, H.; SHIRAISHI, A. TGF- β contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice. **J Immunol**, v. 156, p. 73-8, 1996.

MAKKI, J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. **Clin. Med. Insights Pathology**, v. 9, p. 23–30, 2015.

MALLON, E.; OSIN, P.; NASIRI, N.; BLAIN, I.; HOWARD, B.; GUSTERSON, B. The basic pathology of human breast cancer. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 5, p. 139–63, 2000.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol**, v. 23, p. 10-18, 2002.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, p. 436-444, 2008.

MANTOVANI, A. Molecular pathways linking inflammation and cancer. **Current molecular medicine**, v. 10, p. 369–373, 2010.

MARDEKIAN, S. K.; BOMBONATI, A.; PALAZZO, J. P. Ductal carcinoma in situ of the breast: The importance of morphologic and molecular interactions. **Human Pathology**, v. 49, p. 114–123, 2015.

MAREEL, M.; LEROY, A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. **Physiology Review**, v. 83, p. 337-376, 2003

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.

MBONGUE, M. J.; NICHOLAS, A.D.; TORREZ, T.W.; KIM, N.S.; FIREK, F.A.; LANGRIDGE, H. R. W. The Role of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase in Immune Suppression and Autoimmunity. **Vaccines**, v. 3, p. 703-729, 2015.

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.

MESIANO, S.; WANG, Y.; NORWITZ, E. R. Progesterone receptors in the human pregnancy uterus: do they hold the key to birth timing? **Reproductive sciences**, v. 18, p. 6–19, 2011.

MUNN, D.H.; MELLOR, A.L. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. **Cell Press**, v. 34, p. 137–143, 2015.

MUNIR, S.; LARSEN, S. K.; IVERSEN, T. Z.; DONIA, M.; KLAUSEN, T. W.; SVANE, I. M.; STRATEN, P. T.; ANDERSEN, M. H. Natural CD4+ T-cell responses against indoleamine 2,3- dioxygenase. **Plos One**, v. 7, p. 1-12, 2012.

MICHAEL, P.; SCHEID, P. A. M.; JAMES, R. W. Multiple Phosphoinositide 3-Kinase-Dependent Steps in Activation of Protein Kinase B. **MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY**, v. 22, p. 6247–6260, 2002.

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HÉLIMEN, E.; LIPSCOMB, T. B. Histological classification of mammary tumors of the dog and cat – Worl Health Organization International Histological Classification of tumors and domestic animals. 2. Ed. Washington: **Armed Forces Institute of Pathology**, p. 18-21, 1999.

MOUSER, P.; MILLER, M.A.; ANTUOFERMO, E.; BADVE, S.S.; MOHAMMED, S.I. Prevalence and classification of spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs without clinical mammary disease. **Vet Pathol**, v. 47, p. 275–284, 2010.

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. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, p. 280–290, 2004.

MUNN, D.H.; MELLOR, A.L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. **J. Clin. Investigation**, v. 117, p. 1147–1154, 2007.

NASIR, L.; RUTTEMAN, G.R.; REID, S. W. J.; SCHULZE, C. H.; ARGYLE, D. J. Analysis of p53 mutational events and MDM2 amplification in canine soft-tissue sarcomas. **Cancer Letters**, v. 174, p. 83–89, 2001.

NELSON, E. R.; WARDELL, S. E.; JASPER, J. S.; PARK, S.; SUCHINDRAN, S.; HOWE, M. K. 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. **Science**. v. 342, p. 1094–8, 2013.

NOGUCHI, T.; WARD, J. P.; GUBIN, M. M.; ARTHUR, C. D.; LEE, S. H.; HUNDAL, J. Temporally Distinct PD-L1Expression by Tumor and Host Cells Contributes to Immune Escape. **Cancer Immunology Research**, v. 6, p. 10-17, 2017.

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

OPITZ, C. A.; LITZENBURGER, U. M.; OPITZ, U.; SAHM, F.; OCHS, K.; LUTZ, C.; PLATTEN, M. The indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibitor 1-methyl-D-tryptophan upregulates IDO1 in human cancer cells. **PloS one**, v. 6, p. 198-202, 2011.

ORABONA, C.; PALLOTTA, M. T.; GROHMANN, U. Different partners, opposite outcomes: a new perspective of the immunobiology of indoleamine 2,3-dioxygenase. **Molecular medicine**, v. 18, p. 834–42, 2012.

OBR, A. E.; EDWARDS, D. P. The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. **Mol Cell Endocrinol**, v. 357, p. 4–17, 2012.

OUYANG, L. Y.; WU, X. J.; YE, S. B.; ZHANG, R. X.; LI, Z. L.; LIAO, W. Tumor-induced myeloid-derived suppressor cells promote tumor progression through oxidative metabolism in human colorectal cancer. **J. Transl. Medicine**, v. 13, p. 47-53, 2015.

PALLOTTA, M. T.; ORABONA, C.; VOLPI, C.; GROHMANN, U.; PUC CETTI, P.; FALLARINO, F. Proteasomal Degradation of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in cD8 + Dendritic cells is Mediated by suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3). **International Journal**, v. 3, p. 91–97, 2010.

PALLOTTA, M. T.; ORABONA, C.; VOLPI, C.; VACCA, C.; BELLADONNA, M.L.; BIANCHI, R.; SERVILLO, G.; BRUNACCI, C.; CALVITTI, M.; BICCIATO, S.; MAZZA, E. M.; BOON, L.; GRACCI, F.; FIORETTI, M. C.; FALLARINO, F.; PUC CETTI, P.; GROHMANN, U. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. **Nature immunology**, v. 12, p. 870–8, 2011.

PAPAMITSOU, T.; CHATZISTAMATIOU, M.; GRAMMATIKOPOULOU, D.; PAPADOPOULOU, K.; LAKIS, S.; ECONOMOU, Z.; PAPADOPOULOU, Z.; SIOGA, A. Low expression of Progesterone Receptor A in intermediate trophoblast of miscarriages. **Histology and histopathology**, v. 26, p. 609-614, 2011.

PAULOVICH, A. G.; TOCZYSKI, D. P.; HARTWELL, L. H. When check- points fail. **Cell**, v. 83, p. 315-21, 1997.

PELETEIRO, M. C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Ver. Port. C. Veterinária**, v. 509, p. 10-29, 1994.

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.

POWELL, D. R.; HUTTENLOCHER, A. Neutrophils in the tumor microenvironment. **Trends Immunol**, v. 37, p. 41-52, 2016.

PRIYANKA, H. P.; KRISHNAN, H. C.; SINGH, R. V.; HIMA, L.; THYAGARAJAN, S. Estrogen modulates in vitro T cell responses in a concentration- and receptor-dependent manner: Effects on intracellular molecular targets and antioxidant enzymes. **Molecular Immunology**, v. 56, p. 328–339, 2013.

QUEIROGA, F. L.; PIRES, I.; LOBO, L.; LOPES, C. S. The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. **Res Vet Sci**, v. 88, p. 441–445, 2010.

RAPHAEL, J.; GANDHI, S.; LI, N.; LU, F-I.; TRUDEAU, M. The role of quantitative estrogen receptor status in predicting tumor response at surgery in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. **Breast Cancer Res Treat**, v. 2, p. 14-20, 2017.

REZNIKOV, A. Hormonal impact on tumor growth and progression. **Experimental Oncology**, v. 37, p. 162–170, 2015.

RITPRAJAK, P.; AZUMA, M. Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 51, p. 221-8, 2015.

RIUS, J.; GUMA, M.; SCHACHTRUP, C.; AKASSOGLOU, K.; ZINKERNAGEL, A. S.; NIZET, V.; JOHNSON, R. S.; HADDAD, G. G.; KARIN, M. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 453, p. 807-811, 2008.

RIVERA, P.; MELIN, M.; BIAGI, T.; FALL, T.; HAGG STROM, J.; LINDBLAD-TOH, K.; VON EULER, H. Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. **Cancer Research**, v. 69, p. 8770–8774, 2009.

ROBERTS, E. W.; BROZ, M. L.; BINNEWIES, M.; HEADLEY, M. B.; NELSON, A. E.; WOLF, D. M.; KAISHO, T.; BOGUNOVIC, D.; BHARDWAJ, N.; KRUMMEL, M. F. Critical role for CD103(+)/CD141(+) dendritic cells bearing CCR7 for tumor antigen trafficking and priming of T cell immunity in melanoma. **Cancer Cell**, v. 30, p. 324-336, 2016.

ROMERO-LÓPEZ, M.; TRINH, A. L.; SOBRINO, A.; HATCH, M. M.; KEATING, M. T.; FIMBRES, C.; LEWIS, D. E.; GERSHON, P. D.; BOTVINICK, E. L.; DIGMAN, M. Recapitulating the human tumor microenvironment: Colon tumor-derived extracellular matrix promotes angiogenesis and tumor cell growth. **Biomaterials**, v. 116, p. 118-129, 2017.

RUFFELL, B.; CHANG-STRACHAN, D.; CHAN, V.; ROSENBUSCH, A.; HO, C. M.; PRYER, N. Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. **Cancer Cell**, v. 26, p. 623-37, 2014.

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, W. B. **Saunders Company**, p. 455-477, 2001.

SCHUST, D. J.; ANDERSON, D. J.; HILL, J. A. Progesterone-induced immunosuppression is not mediated through the progesterone receptor. **Human reproduction**, v. 11, p. 980–5, 1996.

SHIAO, S. L.; GANESAN, A. P.; RUGO, H. S.; COUSSENS, L.M. Immune microenvironments in solid tumors: new targets for therapy. **Genes Development**, v. 25, p. 2559–72, 2011.

SHIBUYA, M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. **J Biochem Mol Biology**, v. 39, p. 469–78, 2006.

SILVA, A. E. D.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. *Ciência Rural*, v. 34, p. 625–633, 2004.

SPAGGIARI, G. M.; ABDELRAZIK, H.; BECCHETTI, F.; MORETTA, L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E₂. **Blood**, v. 113, p. 6576-6583, 2009.

SIRACUSA, M. C.; OVERSTREET, M. G.; HOUSSEAU, F.; SCOTT, A. L.; KLEIN, S. L. 17 β -estradiol alters the activity of conventional and IFN-producing killer dendritic cells. **Journal of immunology**, v. 180, p. 1423–31, 2008.

SIONOV, R. V.; FRIDLENDER, Z. G.; GRANOT, Z. The multifaceted roles neutrophils play in the tumor microenvironment. **Cancer Microenvironment**, v. 8, p. 125-158, 2015.

SLEECKX, N.; BRANTEGEM, L.; VAN EYNDEN, G.; DEN, V.; FRANSEN, E. Angiogenesis in Canine Mammary Tumours: A Morphometric and Prognostic Study. **Journal of Comparative Pathology**, v. 150, p. 175–183, 2014.

SLEECKX, N.; DE ROOSTER, H.; VELDHUIS KROEZE, E. J. B.; VAN GINNEKEN, C.; VAN, BRANTEGEM, L. Canine mammary tumours, an Overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 1112–1131, 2011.

SOLIMAN, H.; RAWAL, B.; FULP, J.; LEE, J. H.; LOPEZ, A.; BUI, M. M. Analysis of indoleamine 2-3 dioxygenase (IDO1) expression in breast cancer tissue by immunohistochemistry. **Cancer Immunol Immunother.** v. 62, p. 829-37, 2013.

SONG, S. S.; YUAN, P. F.; CHEN, J. Y.; FU, J. J.; WU, H. X.; LU, J. T.; WEI, W. TGF- β favors bone marrow-derived dendritic cells to acquire tolerogenic properties. **Immunological investigations**, v. 7, p. 1–10, 2014.

SORENMO, K. U.; KRISTIANSEN, V. M.; COFONE, M. A.; SHOFER, F. S.; BREEN, A. M.; LANGE LAND, M.; MONGIL, C. M.; GRONDAHL, A. M.; TEIGE, J.; GOLDSCHMIDT, M. H. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Vet Comp Oncology**, v. 7, p. 162–172, 2009.

SOUSA, S.; BRION, R.; LINTUNEN, M.; KRONQVIST, P.; SANDHOLM, J.; MONKKONEN, J. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. **Breast Cancer Res**, v. 17, p. 101-108, 2015.

SPARMANN, A.; BAR-SAGI, D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. **Cancer Cell**, v. 6, p. 447-458, 2004.

STEPHEN, T. L.; RUTKOWSKI, M. R.; ALLEGREZZA, M. J.; PERALES-PUCHALT, A.; TESONE, A. J.; SVORONOS, N. Transforming growth factor β -mediated suppression of antitumor T cells requires FoxP1 transcription factor expression. **Immunity**, v. 41, p. 427-39, 2014.

STRAUB, R. H. The complex role of estrogens in inflammation. **Endocrine Reviews**, v. 28, p. 521–574, 2007.

SUN, Z.; FOURCADE, J.; PAGLIANO, O.; CHAUVIN, J. M.; SANDER, C.; KIRKWOOD, J. M. Interleukin-10 and programmed death-1 cooperate to regulate tumor antigen-specific CD8⁺ T cells in melanoma patients. **Cancer research**, v. 75, p. 40-46, 2015.

SU, L.; SUN, Y.; MA, F.; LU, P.; HUANG, H.; ZHOU, J. Progesterone Inhibits Toll-like Receptor 4-Mediated Innate Immune response in Macrophages by Suppressing NF-Kappa β Activation Enhancing SOCS1 Expressing. **Immunology Letters**, v. 125, p. 151-155, 2009.

SZEKERES-BARTHO, J.; HALASZ, M.; PALKOVICS, T. Progesterone in pregnancy; receptor– ligand interaction and signaling pathways. **Journal Reproductive Immunology**, v. 83, p. 60–64, 2009.

TAKAHASHI, H.; SAKAKURA, K.; KAWABATA-IWAKAWA, R.; ROKUDAI, S.; TOYODA, M.; NISHIYAMA, M. Immunosuppressive activity of cancer-associated fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Immunol Immunother**, v. 64, p. 1407-17, 2015.

THOMAS, D. A.; MASSAGUE, J. TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. **Cancer Cell**, v. 8, p. 369-80, 2005.

VAN OVERMEIRE, E.; STIJLEMANS, B.; HEYMANN, F.; KEIRSSE, J.; MORIAS, Y.; ELKRIM, Y.; BRYIS, L.; ABELS, C.; LAHMAR, Q.; ERGEN, C. M-CSF and GM-CSF receptor signaling differentially regulate monocyte maturation and macrophage polarization in the tumor microenvironment. **Cancer Res**, v. 76, p. 35-42, 2016.

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, p. 351–360, 2002.

WEI, T.; ZHANG, J.; QIN, Y.; WU, Y.; ZHU, L.; LU, L. Increased expression of immunosuppressive molecules on intratumoral and circulating regulatory T cells in non-small-cell lung cancer patients. **Am J Cancer Research**, v. 5, p. 190-201, 2015.

WILLIAMS, C.; LIN, C. Y. Oestrogen receptors in breast cancer: basic mechanisms and clinical implications. **Cancer medical science**, v. 7, p. 370-375, 2013.

XIAO, B. G.; LIU, X.; LINK, H. Antigen-specific T cell functions are suppressed over the estrogen-dendritic cell-indoleamine 2,3-dioxygenase axis. **Steroids**, v. 69, p. 653–659, 2004.

XU, H.; ZHANG, G. X.; CIRIC, B.; ROSTAMI, A. IDO: a double-edged sword for T(H)1/T(H)2 regulation. **Immunology letters**, v.121, p.1–6, 2008.

YAGI, H.; NOMURA, T.; NAKAMURA, K.; YAMAZAKI, S.; KITAWAKI, T.; HORI, S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. **Int Immunology**, v. 16, p. 43-56, 2004.

YASUI, H.; TAKAI, K.; YOSHIDA, R.; HAYAISHI, O. Interferon γ enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase: it's possible occurrence in cancer patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, p. 622-626, 1986.

YOSHIDA, R.; IMANISHI, J.; OKU, T.; KISHIDA, T.; HAYAISHI, O. Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by Interferon γ . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, p. 129-132, 1981.

YOSHIMURA, A.; WAKABAYASHI, Y.; MORI, T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF- β ? **Journal of Biochemistry**, v. 147, p. 781–792, 2010.

ZHU, W. H.; LU, C. Z.; HUANG, Y. M.; LINK, H.; XIAO, B. G. A putative mechanism on remission of multiple sclerosis during pregnancy: estrogen-induced indoleamine 2,3-dioxygenase by dendritic cells. **Multiple Sclerosis**, v. 13, p. 33–40, 2007.

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. Fine needle aspiration cytologic and histologic correlation in canine tumors mammary tumors. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 38, p. 38-41, 2001.