CARLA SIMONE SOARES

**Avaliação da expressão de indoleamina 2, 3 dioxigenase - IDO nos
leucócitos presentes no tumor ascítico de Ehrlich perante o
bloqueio da via de ativação linfocitária B7+CTLA-4**

São Paulo

2017

CARLA SIMONE SOARES

Avaliação da expressão de indoleamina 2, 3 dioxigenase - IDO nos leucócitos presentes no tumor ascítico de Ehrlich perante o bloqueio da via de ativação linfocitária B7+CTLA-4

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior

De acordo: _____

José Roberto Kfoury Junior

Co-orientadora:

Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira Nishiyama

São Paulo

2017

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP.

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3544
FMVZ

Soares, Carla Simone
Avaliação da expressão de indoleamina 2, 3 dioxigenase - IDO nos leucócitos presentes no tumor ascítico de Ehrlich perante o bloqueio da via de ativação linfocitária B7+CTLA-4. / Carla Simone Soares. -- 2017.
34 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - 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.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior.

Co-orientador: Profa. Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira Nishiyama.

1. Adenocarcinoma. 2. Imunomodulação. 3. Linfócitos. 4. Sistema imune. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da expressão de indoleamina 2, 3 dioxigenase - IDO nos leucócitos presentes no tumor ascítico de Ehrlich perante o bloqueio da via de ativação linfocitária B7+CTLA-4", protocolada sob o CEUA nº 4950170715, sob a responsabilidade de **José Roberto Kfoury Júnior e equipe; Carla Simone Soares; Cícero Júlio Silva Costa; Fernanda Bastianello Junior; Nathália de Angelis Carvalho** - 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 08/12/2016.

We certify that the proposal "Evaluation of the expression of indoleamina 2, 3 dioxigenase-IDO in leukocytes present in Ehrlich ascites tumor before blocking lymphocyte activation pathway B7 + CTLA-4", utilizing 15 Isogenics mice (15 females), protocol number CEUA 4950170715, under the responsibility of **José Roberto Kfoury Júnior and team; Carla Simone Soares; Cícero Júlio Silva Costa; Fernanda Bastianello Junior; Nathália de Angelis Carvalho** - 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 12/08/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2015** a **08/2017**

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

Origem:

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **a**

N: **15**

Linhagem: **Balb/c**

Peso: **a**

Resumo: O tumor de Ehrlich (TE) foi descrito inicialmente, como adenocarcinoma mamário de camundongos. O TE se origina a partir de sucessivos transplantes no peritônio ou tecido subcutâneo de camundongos e se desenvolve na forma ascítica ou sólida. O tumor ascítico de Ehrlich (TAE) tem sido utilizado como um tumor transplantável para o desenvolvimento de várias pesquisas relacionadas à oncologia. Estudos tem demonstrado que o desenvolvimento de TAE resulta no estímulo de células citotóxicas, como os linfócitos T e células Natural Killer (NK), mediadas principalmente por macrófagos. Os macrófagos e as células dendríticas (DCs), em tecidos tumorais, via ligação das moléculas co-estimuladoras B7-1 e B7-2, presentes nestas células, com a molécula CTLA-4, presente em linfócitos T reguladores CD4+ CD25+, além de ativarem a resposta imunológica, induzem a síntese da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO). A IDO é uma enzima que degrada o aminoácido essencial triptofano, sem o qual, não ocorre a ativação e proliferação de linfócitos T e, consequentemente, mecanismos a eles associados como os de rejeição podem ser seriamente comprometidos. No presente estudo, pretende-se avaliar a expressão de IDO nas células imunológicas presentes no tumor ascítico de Ehrlich perante ao bloqueio da via de sinalização B7+CTLA-4, verificando se a IDO expressa nos leucócitos bem como nas APCs, sofre influência desta via de ativação imunológica, tornando viável a investigação de futuras modulações imunológicas através desta enzima.

Local do experimento:

São Paulo, 08 de dezembro de 2016

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: SOARES, Carla Simone

Título: **Avaliação da expressão de indoleamina 2, 3 dioxigenase - IDO nos leucócitos presentes no tumor ascítico de Ehrlich perante o bloqueio da via de ativação linfocitária B7+CTLA-4**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

RESUMO

SOARES, C.S. **Avaliação da expressão de indoleamina 2, 3 dioxigenase - IDO nos leucócitos presentes no tumor ascítico de Ehrlich perante o bloqueio da via de ativação linfocitária B7+CTLA-4** 2017. 34f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O tumor de Ehrlich (TE) foi descrito inicialmente, como adenocarcinoma mamário de camundongos, desenvolvendo-se na forma ascítica ou sólida a partir de sucessivos transplantes no peritônio ou tecido subcutâneo destes animais. O tumor ascítico de Ehrlich (TAE) tem sido utilizado como um tumor transplantável para o desenvolvimento de pesquisas relacionadas à oncologia. Estudos tem demonstrado que o desenvolvimento de TAE resulta no estímulo de células citotóxicas, como os linfócitos T e células Natural Killer (NK), mediadas principalmente por macrófagos. Os macrófagos e as células dendríticas (DCs), podem induzir a síntese da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) em tecidos tumorais, via ligação das moléculas co-estimuladoras B7-1 e B7-2, presentes nestas células, com a molécula CTLA-4 (antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos), presente em linfócitos T reguladores CD4⁺ CD25⁺. A IDO é uma enzima que degrada o aminoácido essencial triptofano, processo que além de levar à privação do mesmo no microambiente celular, gera metabólitos que impedem a ativação e proliferação de linfócitos T e, conseqüentemente, mecanismos a eles associados como os de rejeição podem ser seriamente comprometidos. Mediante o exposto e pela presença de células imunológicas que expressam IDO no microambiente do tumor ascítico de Ehrlich, este trabalho teve como objetivo verificar a expressão da IDO após o bloqueio da interação B7/CTLA-4 por meio da citometria de fluxo. De acordo com as análises realizadas, os resultados demostraram que houve redução de 4,9% para 2,53% na expressão da enzima IDO. Em face dos resultados, parece plausível sugerir que o bloqueio desta via de ligação foi eficaz na redução dos níveis de atividade da IDO, o que poderia restaurar a capacidade de resposta dos linfócitos T contra as células tumorais. Nesta perspectiva sobre a IDO como mediadora no controle do escape imune feito pelas células tumorais, tais resultados podem colaborar para modulação desta enzima no microambiente tumoral.

Palavras-chave: Adenocarcinoma, linfócitos, triptofano, sistema imunológico.

ABSTRACT

SOARES, C.S. **Influence of the lymphocyte activation pathway B7 + CTLA-4 on the expression of indoleamina 2, 3 dioxygenase - IDO in leucocytes present in Ehrlich ascites tumor** 2017. 34f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The Ehrlich tumor (TE) was first described, as breast adenocarcinoma of mice. The TE develops in ascitic or solid form from successive transplantations in the peritoneum or subcutaneous tissue of these animals. The Ehrlich ascites tumor (TAE) has been used as a transplantable tumor for the development of research related to oncology. Studies have shown that the development of TAE results in stimulation of cytotoxic cells, such as T lymphocytes and Natural Killer cells (NK), mediated mainly by macrophages. Macrophages and dendritic cells (DCs) in tumor tissues, via co-stimulation of molecules B7-1 and B7-2, present in these cells, together with the CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated antigen 4) molecule, present on regulatory T CD4 + CD25 + lymphocytes, may induce the synthesis of indoleamine 2, 3 dioxygenase (IDO). IDO is an enzyme that catabolizes the essential amino acid tryptophan, impairing activation and proliferation of T lymphocytes and consequently, compromising mechanisms associated with them such as rejection. Considering the presence of immune cells in the tumor microenvironment Ehrlich ascites that express IDO, this study aimed to verify the expression of IDO after the blockade of interaction B7/CTLA-4 by flow cytometry. Results demonstrated that there was a reduction of 4.9% to 2.53% in the expression of IDO. Given the results, it seems plausible to suggest that blocking this binding via was effective in reducing the levels of expression of IDO, which could restore the responsiveness of T cells against tumor cells. In this perspective on the IDO as a mediator in the control of immune escape made by tumor cells, these results may collaborate for modulation of this enzyme in the microenvironment.

Keywords: Adenocarcinoma, lymphocytes, tryptophan, immune system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Degradação do aminoácido Triptofano pela ação da IDO.....	15
Figura 2. Esfregaço do líquido ascítico do camundongo	21
Figura 3. Aquisições em histograma dos diferentes tipos celulares encontrados no TAE.....	22
Figura 4. Aquisições em histograma da expressão de IDO sem e com bloqueio.....	25
Figura 5. Valores médios e respectivo desvio padrão obtidos pela citometria de fluxo para expressão de IDO com e sem bloqueio de CTLA-4 de nove animais (três grupos de três animais) portadores do TAE	25

LISTA TABELAS

Tabela 1. Características dos anticorpos primários	19
Tabela 2. Características dos anticorpos secundários	20
Tabela 3. Média dos valores dos tipos celulares, feita por análise de citometria de fluxo, utilizando o software FlowJo versão 7.6.5., de nove animais (três grupos de três animais) portadores do TAE.....	24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	O Sistema Imunológico	12
2.2	Indoleamina 2, 3-dioxigenase	14
2.3	Tumor de Ehrlich	16
3	OBJETIVOS	17
3.1	Objetivo Geral	17
3.2	Objetivo Específico	17
4	MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1	Cultivo celular	18
4.2	Citometria de fluxo	19
4.3	Análise estatística	20
5	RESULTADOS	21
5.1	Caracterização das células do tumor ascítico de Ehrlich	21
5.2	Imunofenotipagem dos leucócitos presentes no TAE	21
5.3	Avaliação da expressão de IDO	24
6	DISCUSSÃO	25
7	CONCLUSÃO	29
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1 INTRODUÇÃO

As moléculas co-estimuladoras CD80 (B7₁) e CD86 (B7₂) são expressas predominantemente na superfície das células apresentadoras de antígeno - APCs (células dendríticas, linfócitos B e T ativados e macrófagos) (AMODIO, GREGORI, 2012; HAMMER, 2013; VON RANGO, 2008). Estas moléculas, ao se ligarem ao CD28, principal receptor co-estimulador na liberação de sinais secundários para ativação das células T, além de potencializar sua capacidade de apresentar os antígenos às células T, estimulam estas células a expressar outro receptor, o CTLA-4 (antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico ou CD152). O CTLA-4 tem maior afinidade pelos ligantes B7 comparado ao CD28 fazendo com que pequena quantidade de CTLA-4 seja suficiente para que essas moléculas (B7₁ e B7₂) deixem de se ligar ao CD28 e se liguem ao CTLA-4, regulando de forma negativa as respostas imunológicas, inibindo a ativação das células T (WEIHONG et al, 2009).

A ligação das moléculas B7₁ e B7₂, presentes nas células dendríticas (DCs), com a molécula CTLA-4, encontrada em linfócitos T, pode induzir a síntese da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) pelas células DCs e macrófagos (GROZDICS et al, 2014). A IDO é uma enzima que degrada o aminoácido essencial triptofano (Trp), impedindo a ativação e proliferação das células de determinado microambiente, principalmente as células imunológicas (MELLOR, 2005; TRABANELLI, 2011; MUNIR et al, 2012). A expressão de IDO é induzida especialmente pelo interferon gama (IFN- γ), enquanto citocinas como IL-4, IL-6, IL-13 e Fator de Crescimento Transformante beta (TGF- β) são apontadas como supressoras de IDO.

O Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) tem sido utilizado para investigar os efeitos antitumorais em vários compostos e moléculas (SILVA et al, 2004; FERNANDES et al, 2015). Estudos recentes têm utilizado o TAE para analisar a IDO, provocando sua inibição nas células do microambiente tumoral (BOGDANOVA et al, 2013) e, dessa forma, observando o impacto desse bloqueio, como a regressão tumoral. Assim, neste trabalho, espera-se diminuir a expressão da enzima IDO ao bloquear a via de ligação B7/CTLA-4.

Mediante o exposto e pela presença de células imunológicas que expressam IDO no microambiente do TAE, este estudo tem como objetivo contribuir para o

melhor entendimento do papel das moléculas B7/CTLA-4 na ativação da IDO, buscando uma futura modulação desta enzima no microambiente tumoral, sendo de grande relevância para o controle da evasão imunológica feita pelas células tumorais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Sistema Imunológico

O sistema imunológico é constituído por uma rede de órgãos, células e moléculas, e tem por finalidade manter a homeostase do organismo, combatendo as agressões em geral (CRUVINEL et al, 2010).

As células dendríticas (DCs), especializadas na captura e apresentação de antígenos para os linfócitos, são consideradas uma ponte entre a imunidade inata e a adquirida, por serem atraídas e ativadas por elementos da resposta inata e viabilizarem a sensibilização de linfócitos T da resposta imune adquirida. Essas células orquestram a migração de outros tipos de células imunes dentro dos linfonodos via secreção de quimiocinas e regulam a diferenciação, a maturação e a função dos linfócitos T. As células dendríticas são decisivas para a determinação da ativação e do tipo de imunidade mediada pelos linfócitos. Em geral, DCs imaturas são tolerogênicas, enquanto as DCs maduras são imunoestimuladoras. Entretanto, em alguns contextos, DCs maduras podem expandir a população de linfócitos T reguladores (T_{regs}). Os linfócitos T_{regs} compreendem uma família celular capaz de modular as respostas imunológicas. Esta modulação é mediada pela liberação de citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β e para que ocorra é necessário contato entre as células T, a partir da sinalização entre as mesmas (CLARK, CHAUOAT, 2010), assim como a presença de moléculas co-estimuladoras, presentes principalmente nas células apresentadoras de antígeno (APCs), as quais irão interagir com seus receptores, localizados nas células T, tornando possível o início de uma resposta a um determinado agente invasor. Atuam em uma complexa rede de mecanismos reguladores destinados a assegurar a modulação das respostas imunológicas frente aos diversos antígenos provenientes de agentes infecciosos, tumores, aloantígenos, autoantígenos e alérgenos (JÚNIOR et al, 2010).

Um dos mecanismos mediados pelos linfócitos T_{regs} está relacionado à expressão da molécula CTLA-4, uma molécula que atua no sistema imunológico ativado, com objetivo de manter sua homeostase. Nos tumores, essa molécula suprime a proliferação das células T, regulando a resposta imune antitumoral (DAL BELLO et al, 2017). Ela também pode inibir os sinais para apresentação do antígeno ao TCR e reduzir a produção de interleucina 2 (IL-2), principal fator estimulador de células T que induz a progressão do seu ciclo celular (TOST, COCOROCCHIO, PENNACCHIOLI, 2013). Além de regular negativamente as células T ativadas na ligação com as moléculas B7, como mencionado anteriormente, a ligação de CTLA-4 com as moléculas B7 nas DCs inibe a ligação dessa molécula (CTLA-4) com CD28 nos linfócitos T e induz a expressão de IDO, que é considerada crucial na supressão da proliferação e sobrevivência dos linfócitos T (MELLOR, MUNN, 2004).

A IDO é uma enzima que degrada o aminoácido triptofano, conhecida pelos seus efeitos diretos sobre os linfócitos T efetores (MELLOR, MUNN, 1999). Os metabólitos produzidos pela IDO inibem a proliferação dos linfócitos T e promovem a apoptose, exercendo diferentes efeitos na resposta dos linfócitos T auxiliares, por alteração entre a diferenciação dos linfócitos naive T helper em T helper 1 (Th_1) ou T helper 2 (Th_2) (TERNESS et al, 2002).

Outro mecanismo de indução da IDO ocorre nos macrófagos a partir da ativação do CD40 e interferon gama ($IFN-\gamma$) (HWU et al, 2000). Entretanto, nas DCs murinas que expressam B220 (uma forma de CD45) ou $CD8\alpha$, a interação das moléculas CTLA-4/CD28 com $B7_1/B7_2$, atua aumentando a expressão de IDO, independente de $IFN-\gamma$ (MELLOR, MUNN, 2004). Além disso, foi demonstrado que a IDO é capaz de inibir tanto linfócitos T auxiliares (CD4) quanto linfócitos T citotóxicos (CD8) e que o bloqueio da mesma está relacionado com a piora do quadro inflamatório no modelo murino.

CASO et al, em 2010, demonstrou em um estudo, que macrófagos peritoneais de camundongos inoculados com tumor mamário D1-DMBA3 tem sua função inflamatória prejudicada e se apresentam menos diferenciados do que em camundongos sem o tumor. Foi realizada uma avaliação dos monócitos do sangue periférico de camundongos que possuíam este tumor, e constatou-se que essas mesmas células já apresentavam seu perfil de ativação alterado antes de se tornarem macrófagos. Os resultados desta pesquisa demonstraram que os

monócitos circulantes destes animais expressavam atividade anti e pró-inflamatória, mostrando assim, sua importância na regulação da resposta imunológica (MUNN, 2006).

2.2 Indoleamina 2, 3-dioxigenase

As oxigenases são enzimas que catalisam a incorporação de um átomo de oxigênio (O_2) em sua molécula. Estudos relatam dois hemes contendo dioxigenase, a indoleamina 2, 3-dioxigenase (IDO) e triptofano 2, 3-dioxigenase (TDO), ambas responsáveis pelo catabolismo do triptofano (TRABANELLI, 2011; MUNIR et al, 2012).

A IDO é uma enzima intracelular que pode ser expressa por vários tipos de células, como os fibroblastos, células endoteliais, epiteliais, estromais, tumorais e alguns tipos celulares do sistema imunológico, como as DCs e os macrófagos. A expressão de IDO em APCs pode privar os patógenos de acesso ao Trp e expor os mesmos a catabólitos tóxicos, levando tais agentes invasores a apoptose (MULLER et al, 2005). MUNN, MELLOR, 1999, demonstraram que o efeito imunomodulador da IDO está relacionado à degradação de triptofano, associado aos metabólitos gerados pela depleção deste aminoácido essencial, mais especificamente derivados da quinurenina (Figura 1). Desta forma, além de inibir a ativação das células T pela privação deste aminoácido, os derivados da quinurenina inibem a proliferação das células T e induzem sua apoptose (FALLARINO et al, 2002).

Figura 1. Degradação do Triptofano pela ação da IDO.

Para que ocorra o catabolismo do triptofano pela IDO, torna-se necessário que a sua expressão seja estimulada. O IFN- γ induz a atividade bioquímica e funcional da IDO, pois leva a expressão de genes que produzem esta enzima, estimulando a degradação do Trp em quinurenina (Kyn) (YOSHIDA et al, 1981; YASUI et al, 1986; KUDO, 2004; BOASSO et al, 2005). O IFN- γ , citocina frequentemente encontrada em processos inflamatórios, é um potente indutor de IDO (MELLOR et al, 2002; MUNN, MELLOR, 2007; HUANG, 2010). A atividade de IDO induzida por IFN- γ tem sido associada a efeitos anti-proliferativos sobre as células imunitárias, incluindo as células T citotóxicas, conduzindo à indução de tolerância imunológica durante a prenhez, transplantes e tumores (CROITORU-LAMOURY et al, 2011). A IDO possui diversas funções biológicas, participando em ambas as respostas inata e adquirida. Quando expressa por APCs profissionais pode criar imunossupressão local e promover a tolerância sistêmica ativando as T_{regs}. A maioria dos estudos realizados demonstra que a expressão elevada de IDO no tumor ou nos nódulos linfáticos de drenagem tem sido associado a um prognóstico desfavorável, uma vez que em alguns tumores as próprias células tumorais expressam IDO (MUNN, MELLOR 2016). A atividade enzimática pode ser

inibida pelo 1-metil triptofano (1-MT), inibidor competitivo da IDO revertendo o efeito supressor sobre as células T (ASGHAR et al, 2015). O papel desempenhado pela IDO pode ser considerado paradoxo, uma vez que pode atuar em benefício ou prejuízo do hospedeiro (MUNN, MELLOR, 2012).

2.3 Tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich (TE) é uma neoplasia transplantável utilizada para avaliações experimentais, correspondente ao adenocarcinoma mamário de camundongos fêmeas (FERNANDES et al, 2015) e desenvolve-se em duas variáveis de comportamento de acordo com o local do implante. Quando a inoculação das células é realizada na cavidade peritoneal, cresce em suspensão, traduzindo-se na forma ascítica do tumor (TAE). Já a inoculação de células quando implantadas por via subcutânea, cresce sob a forma sólida. Pode-se afirmar que o TE, por ser um dos primeiros tumores transplantáveis conhecidos, é o mais extensamente utilizado para experimentação (GUERRA, 1983). A vantagem de utilizar neoplasias transplantáveis, é o conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais a serem inoculadas e o desenvolvimento rápido da neoplasia, restringindo o tempo de estudo (SILVA et al, 2006), já que a forma ascítica atinge seu pico de proliferação no sétimo dia.

A forma ascítica, após aproximadamente sete dias de implante na cavidade peritoneal, se caracteriza macroscopicamente pela grande quantidade de fluido discretamente viscoso e de aspecto leitoso. A histologia do tumor se caracteriza por apresentar parênquima indiferenciado e estroma delicado. As células tumorais são arredondadas, com limites celulares distintos, citoplasma escasso, núcleo central redondo ou ovoide, denso, com nucléolos proeminentes e pleomorfismo celular evidente. Mitoses são frequentemente observadas. Seu estroma é formado por fibras colágenas e delicados capilares (GUERRA, 1983).

O TAE se caracteriza por uma elevada taxa de consumo de glutamina, através da secreção de uma variedade de citocinas imunossupressoras e por uma falta de expressão de MHC-II. Estes acontecimentos resultam em uma disfunção da

vigilância imunológica de células T e NK e no recrutamento de macrófagos, levando à diminuição da imunocompetência (VALADARES et al, 2003).

FECCHIO, et al, 1990, ao estudar o TAE mostrou a presença de reação inflamatória no local de sua inoculação, gerando alterações nos padrões de migração celular. A presença desse tumor inibiu o influxo de leucócitos polimorfonucleares para o foco inflamatório onde foi implantado o tumor, entretanto não alterou o influxo de células inflamatórias para um foco distante do implante tumoral. Esse resultado sugere que o tumor apresenta um efeito inibidor no influxo de leucócitos e que este efeito é exercido localmente.

A resposta imunológica do hospedeiro parece desempenhar importante papel no desenvolvimento do TAE, uma vez que na evolução tumoral existe a presença de infiltrado inflamatório, constituído por leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos, tanto no estroma como na periferia de tecidos neoplásicos, o que contribui para a realização deste estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a via de ativação da expressão de indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) pelos receptores B7+CTLA-4.

3.2 Objetivo Específico

Bloquear a via de sinalização B7+CTLA-4 e verificar suas consequências na expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos desse trabalho foram aprovados pelo CEUA-FMVZ, protocolo nº 4950170715.

O fluido ascítico foi coletado de camundongos fêmeas da linhagem Balb/C (3 grupos com $n = 3$), portadores do tumor de Ehrlich na forma ascítica, com 56 a 84 dias de idade, pesando cerca de 20-30 g, provenientes do biotério do Departamento de Patologia da FMVZ/USP. Estes foram mantidos durante o experimento em caixas de polycarbonato forrada com maravalha, sob iluminação e condições climáticas controladas, usufruindo de água *ad libitum* e ração balanceada. Os animais foram eutanasiados pelo método de câmara de CO₂ e, após a eutanásia, foram levados para sala estéril, na qual o fluido intraperitoneal do camundongo doador foi coletado e diluído em solução fosfato salina tamponada (PBS). As células do fluido peritoneal foram contadas na câmara de Neubauer e sua viabilidade analisada pelo teste de exclusão por azul de tripan (a 0,4%). Em seguida, foi inoculado no peritônio do animal receptor 0,1 mL desta suspensão contendo $5,0 \times 10^6$ de células tumorais com pelo menos 90% de viabilidade, sendo deixados no animal doador por cinco dias objetivando um bom desenvolvimento do tumor.

4.1 Cultivo Celular

As células coletadas do fluido ascítico, foram ressuspensas em solução fosfato salina sem Ca²⁺ e Mg²⁺ (PBS) e submetidas à centrifugação (600x g, por 5 minutos a 4°C). Após a centrifugação o sobrenadante foi removido e o pellet celular ressuspendido em 15mL de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino). Em seguida foi realizada a contagem das células pelo método de exclusão com azul de trypan (Sigma-Aldrich). Uma concentração de 1×10^6 células foi colocada em poços de placas P6 (6 poços) não aderentes em 1mL de meio de cultivo e incubadas a 37° C e 5% de CO₂ por 18 horas.

Os experimentos foram realizados em triplicatas, com as seguintes condições experimentais:

- 1) Sem tratamento, somente células em meio de cultura RPMI 1640: grupo controle;
- 2) Células em meio de cultura RPMI 1640 + 10ug/mL do bloqueador Anti-CTLA-4, clone 63828 (R&D Systems).

4.2 Citometria de fluxo

Os experimentos de citometria de fluxo foram realizados nos citômetros de fluxo FACS Aria I/II (BD Bioscience, California, USA) e FACSCalibur (BD Bioscience, USA/Cytex Bioscience, USA), seguindo as recomendações do MIFlowCyt (Lee, Spidlen *et al.*, 2008). Os resultados foram analisados e processados no programa computacional *FlowJo* 7.6.3 (Tree Star INC., USA).

A imunofenotipagem dos leucócitos, e a verificação da expressão de IDO perante o bloqueio da via de sinalização B7+CTLA-4. Antes da marcação com o anticorpo primário (Tabela 1) as células foram lavadas em Solução Fosfato Salina (PBS) e permeabilizadas com Triton-X (Inlab-Brasil) 0,1% por 20 minutos, e, em seguida, centrifugadas a 1.500g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ressuspenso em 1mL de solução de bloqueio (PBS + albumina sérica bovina (BSA) 2,5%) por 20 minutos e cada amostra foi incubada com o anticorpo primário por 30 minutos (Tabela 1).

Tabela 1. Características dos anticorpos primários utilizados.

Antígeno	Código	Hospedeiro	Diluição*	Referência
Anti-CD4	OX-35	Camundongo	1:100	Novus Biologicals
Anti-CD8	OX- 8	Camundongo	1:100	AbD Serotec
Anti-B7 H1	130002	Camundongo	1:100	R&D Systems
Anti-CD11c	N418	Camundongo	1:50	Biolegend
Anti-F4/80	BM8	Camundongo	1:100	Biolegend
NK Cell Marker	59340	Camundongo	1:100	Santa Cruz
Anti-CTLA-4**	63828	Camundongo	1:100	R&D Systems
Anti-IDO1	IM-402	Coelho	1:100	Imuny

*A diluição foi previamente padronizada em experimentos com diferentes concentrações dos anticorpos, conforme indicado pelo fabricante.

**Anticorpo Anti-CTLA-4 (63828) marcador e bloqueador.

Após a incubação do anticorpo primário, as células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário (Tabela 2) por 30 minutos. Ao final, as células foram lavadas novamente com PBS e procedeu-se à leitura em Citômetro de Fluxo FACSARIAII (BD Bioscience).

Tabela 2. Características dos anticorpos secundários utilizados.

Anticorpo	Código	Diluição*	Fonte
Goat anti-coelho IgG 633	A21070	1:200	Thermofisher
Goat anti-camundongo FITC	F0479	1:200	Sigma-Aldrich
Goat anti-camundongo PE	A9044	1:200	Sigma-Aldrich

* A diluição foi previamente padronizada em experimentos com diferentes concentrações do anticorpo, conforme indicado pelo fabricante.

Os 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.

4.3 ANÁLISE ESTÁTÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 6.0 (Graph Pad Software Inc., USA). Foi realizado teste-t de Student e diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das células do tumor ascítico de Ehrlich

Histologicamente, a análise do esfregaço do grupo controle apresentou uma população celular abundante com predominância de células neoplásicas e a evidente presença de linfócitos (Figura 1).

Figura 2. Esfregaço do líquido ascítico do camundongo. Podem-se notar as células de origem tumoral (T), caracterizadas pelo citoplasma escasso, núcleo central redondo e evidente presença de linfócitos (L). A coloração utilizada foi a de Giemsa.

5.2 Imunofenotipagem

Aquisições em histograma dos diferentes tipos celulares encontrados no TAE, são apresentados nas figuras 3 (A-I).

NK

CD4

CD8

DC

Figura 3. Aquisições em histograma dos diferentes tipos celulares encontrados no TAE. (A) Diferentes tipos celulares segundo tamanho e complexidade interna. (B) Controle. (C) NK. (D) CD4. (E) CD8. (F) DC. (G) Macrófago, (H) B7 e (I) CTLA-4.

A tabela 3 mostra a média dos valores (%) e desvios padrões analisadas por meio da citometria de fluxo, a partir dos resultados obtidos de nove animais (três grupos de três) portadores do TAE.

Tabela 3. Média dos valores dos tipos celulares, feita por análise de citometria de fluxo, utilizando o software FlowJo versão 7.6.5., de nove animais (três grupos de três animais) portadores do TAE.

PARÂMETROS	%
Linfócitos CD4	19,9 ± 58
Linfócitos CD8	58,6 ± 10,1
Macrofágos	0,59±0,24
Células NK	27,0±9,85
DCs	8,8±1,94
B7	83,9±8,68
CTLA-4	0,85±0,46

5.3 Avaliação da expressão de IDO

Após a padronização dos anticorpos, realizou-se a análise por citometria de fluxo com 10^6 células do tumor ascítico de Ehrlich de três diferentes animais, os quais foram tratados durante 1h com o anticorpo Anti-CTLA-4 (10 μ g/ml) para bloqueio/neutralização da via CTLA-4/B7. As figuras 4A e 4B ilustram respectivamente, a expressão da IDO antes do bloqueio de CTLA-4 e após o bloqueio de CTLA-4, respectivamente. A figura 5 ilustra os valores da expressão de IDO obtidos nos grupos com células tratadas e não tratadas com anti-CTLA-4.

A análise estatística mostrou que há diferença significativa entre os dados obtidos após o bloqueio com (10 μ g/ml) de anti-CTLA-4 ($p < 0,05$, teste “t” de Student).

4A

IDO sem bloqueio
CTLA-4

4B

IDO com bloqueio
CTLA-4

Figura 4. Expressão da IDO sem bloqueio de CTLA-4. (4A) Expressão da IDO com bloqueio de CTLA-4 (4B).

Figura 5. Valores médios e respectivo desvio padrão obtidos pela citometria de fluxo para expressão de IDO com e sem bloqueio de CTLA-4 de nove animais (três grupos de três animais) portadores do TAE. Os resultados apresentados representam o valor de p, sendo considerada significativa quando p é menor que 0,05.

A média de expressão de IDO em células dos animais portadores do TAE tratadas com bloqueador anti-CTLA-4 foi de $2,53 \pm 1,3$ com significância estatística em $p < 0,01$.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo verificou o efeito do bloqueio da molécula CTLA-4 (antígeno-4 associado ao linfócito T citotóxico) sobre a expressão de IDO nas células presentes no microambiente do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e evidenciou a diminuição da expressão de IDO de 4,09% para 2,53%, mais especificamente nas células T ativadas, uma vez que nestas células ocorrem a via de ligação B7/CTLA-4.

O esfregaço do fluído ascítico do Tumor de Ehrlich, histologicamente apresentou predominância de células tumorais, com características de acordo com o descrito na literatura (GUERRA, 1983), células arredondadas, citoplasma escasso, nucléolo proeminente e evidente pleoformismo celular, além disso, como relatado por FECCHIO et al, 1990, durante o desenvolvimento do TAE nota-se a presença de infiltrado inflamatório significativo, trazendo para o local do implante células do sistema imunológico, como os linfócitos que estavam evidentes em nossos resultados. Sendo assim, a presença de células imunes do hospedeiro pode explicar a expressão de IDO, uma vez que a enzima atua nestas células pela depleção local de triptofano (Trp) (THÉATE et al, 2015, DAL BELLO et al, 2017) elevando, consequentemente a concentração de quinurenina (Kyn), um dos catabólitos resultantes da degradação de Trp, além disso, sabe-se que em tumores, a expressão de IDO permite que a via Kyn permaneça ativada (MUNN, SHARMA, MELLOR, 2004), o que também contribui para o aumento da produção de metabólitos tóxicos para células T. A Kyn leva à indução da apoptose de células T

ativadas, atenuando a resposta imunológica em determinado microambiente, impedindo, neste caso, o combate às células tumorais (THÉATE et al 2015; ZHAI et al, 2017; LEGÁNY et al 2017). Ainda, a liberação de Kyn provoca mudanças no perfil das células T CD4⁺ para células T_{regs} pela ligação da Kyn com seu receptor específico aril-hidrocarboneto (AhR) presente nos linfócitos T CD4⁺ (MUNN, MELLOR, 2007, MUNN, MELLOR, 2016), sendo que as T_{regs} podem contribuir para diminuição da resposta inflamatória, exercida inicialmente no microambiente tumoral, favorecendo a formação de um ambiente tolerogênico. Além disso, as células T_{regs} exercem uma função no controle da tolerância e diferenciação das células T periféricas pela expressão de CTLA-4, inibindo a proliferação destas células e de sua resposta. Desta forma, ao bloquearmos a via de ligação B7/CTLA-4, os efeitos sobre as células T foram revertidos e a expressão da enzima IDO, consequentemente, diminuída. As T_{regs} também podem induzir a síntese da enzima IDO em células apresentadoras de antígenos (APCs), principalmente nas células dendríticas (DCs), a partir de estímulos pró-inflamatórios, como o IFN- γ , encontrado frequentemente em processos inflamatórios, e pela ligação das moléculas B7, expressas em sua superfície com o receptor CTLA-4, interferindo na produção de interleucina 2 (IL-2) que interrompe a progressão do ciclo celular das células T ativadas, gerando assim, atividade imunossupressora nas DCs (HRYNIEWICZ et al, 2006; TOSTI et al, 2013), o que pode contribuir para o aumento da expressão da IDO e favorecer a progressão tumoral. Tem sido descrito que a ativação ou inibição das moléculas expressas por DCs, tais como B7₂ (CD86), TLRs (receptores Toll-Like) e PD-L1(programador de morte celular 1), pode definir seu fenótipo imunogênico (HUANG et al, 2010; MACKERN-OBERTI et al, 2015). Logo, as células T ativadas por DCs que expressam a IDO reconhecem o antígeno e entram no ciclo celular, mas a atividade da IDO bloqueia posteriormente a progressão deste ciclo e promove a apoptose das células T. A IDO também inibe a maturação das DCs através da inanição de Trp, a partir da redução energética generalizada nas células, e da secreção de Kyn, mostrando ser eficaz em estimular a apoptose das células T e a proliferação das células T_{regs} (HARDEN, EGILMEZ, 2012). Assim, a atividade imunossupressora gerada nas DCs associada à ação da enzima IDO favorece o desenvolvimento tumoral e consequente prognóstico desfavorável.

Interessante que KUDO et al, 2004 e BOASSO et al, 2005 comprovaram que o IFN- γ é necessário para que ocorra o catabolismo do Trp pela IDO. Entretanto, estudando o sistema murino, descobriu-se que as células T ativadas fornecem um sinal adicional além do IFN- γ , capaz de induzir a expressão da enzima, a interação das moléculas B7 presentes nas DCs com seus receptores CD28 e CTLA-4 presentes nas células T, o que explica a expressão de 4,09% da enzima antes de realizarmos o bloqueio com Anti-CTLA-4. Este mesmo estudo também verificou que a expressão da IDO pela ligação das moléculas B7 com CTLA-4 em T_{regs} pode funcionar como um regulador fisiológico nas respostas das células T *in vivo*. Com a inibição farmacológica da IDO a atividade tolerogênica de CTLA-4 foi completamente revertida, sendo que ao bloquear CTLA-4 obtiveram uma redução significativa de Kyn. Entretanto, para que a atividade supressora da IDO fosse completamente anulada foi necessária à utilização de anticorpos em conjunto para bloquear tanto CTLA-4 como CD28 (MUNN et al, 2004). Nós não associamos anticorpos para bloquear a ação de IDO e CTLA-4, entretanto, evidenciamos *in vitro*, a diminuição da expressão da enzima IDO utilizando o anticorpo para bloquear a via de ligação B7/CTLA-4.

Outros estudos comprovam que ao bloquear a via de ligação B7/CTLA-4 com anticorpo anti-CTLA-4, a interação da via B7/CD28 é restabelecida, promovendo a regulação positiva das células T, além de inibir a função das T_{regs}, diminuindo a expressão da enzima IDO (GALANINA et al, 2017, GROSSO, KUNKEL-JURE, 2013, RIBAS, 2009), condizente com os resultados obtidos em nosso trabalho. De fato, ao se considerar que as moléculas B7 possuem afinidade superior na interação com CTLA-4 do que com CD28, ao se bloquear CTLA-4 espera-se a redução na expressão da IDO, o que foi comprovado nas análises realizadas em nosso estudo. Contrastando com estes resultados, autores de um estudo realizado em pacientes com melanoma metastático, forneceram evidências de que após o bloqueio de CTLA-4, a frequência e a função das T_{regs} não foram alteradas, provocando assim, o aumento acentuado da enzima IDO. Tal fato pode ter ocorrido, devido ao microambiente imunossupressor que poderia impedir que células T infiltrassem no tumor, resultando em resistência a terapia instituída (HOLMGAARD et al, 2013). Contudo, em vários modelos de tumores transplantados, tais como carcinoma colorretal, carcinoma renal, carcinoma prostático, carcinoma mamário, fibrossarcoma

e linfoma, a utilização de anticorpos anti-CTLA-4 para bloquear a via de ligação B7/CTLA-4 induziram a rejeição de células tumorais (GROSSO, KUNKEL-JURE, 2013), inibindo a função das células T reguladoras e consequente diminuição da IDO, o que confere a enzima um papel regulador positivo nas imunoterapias contra os tumores. Portanto, a expressão da IDO por esta via de ligação é crítica, pois gera tolerância aos antígenos tumorais, mas ao mesmo tempo promissora devido suas implicações positivas na imunoterapias. Os efeitos antitumorais parecem ser eficazes quando foram instituídas terapias associando-se o inibidor da IDO e de CTLA-4 (MUNN, MELLOR, 2016, HOLMGAARD et al, 2013), pois quanto menor a expressão de IDO, maior será a resposta imunológica contra as células tumorais. Em um estudo realizado por HOLMGAARD et al, 2013 foi evidenciado que a expressão da IDO exerce papel inibitório na terapia com anti-CTLA-4 e que, ao se associar um inibidor farmacológico para IDO com um bloqueador de CTLA-4 os efeitos permitiram uma maior eficácia do tratamento, uma vez que o desenvolvimento das células tumorais pode ser favorecido tanto pela inibição quanto pela mudança de perfil das células imunológicas induzidas pela ação da IDO (MULLER et al, 2005). Embora, não tenha sido foco desta pesquisa, a associação desta imunoterapia parece se justificar, uma vez que reduziria os efeitos negativos desta enzima de forma mais eficiente que a monoterapia, favorecendo o reestabelecimento da resposta celular ao tumor, demonstrando ser uma terapêutica promissora.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que o bloqueio da via de ligação B7/CTLA-4 *in vitro* foi eficaz na diminuição da expressão da enzima IDO no tumor ascítico de Ehrlich, indicando razões para busca contínua dos diversos mecanismos que esta enzima utiliza na supressão da resposta imunológica nos tumores.

8 REFERÊNCIAS

- AMODIO, G. E GREGORI, S. Dendritic cells: a double-edge sword in autoimmune responses. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 233, August, 2012.
- ASGHAR, K.; ASHIQ, M.T.; ZULFIGAR, B.; MAHROO, A.; NASIR, K.; MURAD, S. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression and activity in patients with hepatitis C virus-induced liver cirrhosis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 9(3), p. 901-904, March, 2015.
- BOASSO, A.; HERBEUVAL, J. P.; HARDY, A. W.; WINKLER, C.; SHEARER, G. M. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4⁺ T cells. **Blood**, v. 105, p. 1574-1581, February, 2005.
- BOGDANOVA, L. A.; MOROZKOVA, T.S.; AMITINA, S.A.; MAZHUKIN, D.G.; NIKOLIN, V.P.; POPOVA, N.A.; KALEDIN, V.I. Dual effects of indoleamine 2,3-Dioxygenase inhibitors on the therapeutic effects of cyclophosphamide and cycloplatum on ehrlich ascites tumor in mice. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 157, n. 4, p. 506-509, August, 2014.
- CASO, R.; SILVEIRA, R.; CARRIO, R.; IRAGAVARAPU-CHARYULU, V; GONZALES-PERES, R. R.; TORROELLA-KOURI, M. Blood monocytes from mammary tumor-bearing mice: early targets of tumor-induced immune suppression? **International Journal of Oncology**, v. 37, n. 4, p. 891-900, October, 2010.
- CLARK, D.A.; CHAOUAT, G. Regulatory T cells and reproduction: how do they do it? **Journal of Reproductive Immunology**, v. 87, p. 14-20, December, 2010.
- CROITORU-LAMOURY, J.; LAMOURY, F. M. J.; CARISTO, M.; SUZUKI, K.; WALKER, D.; TAKIKAWA, O.; TAYLOR, R.; BREW, B. J. Interferon-γ regulates the proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells via activation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). **Plos One**, v. 6 (2), February, 2011.
- CRUVINEL, W.M.; JÚNIOR, D.M.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; SILVE, N.P.; ANDRADE, L.E.C. Sistema imunitário – Parte I Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.4, p.434-461, Janeiro, 2010.
- DAL BELLO, M.G.; ALAMA, A.; COCO, S.; VANNI, I.; GROSSI, F. Understanding the checkpoint blockade in lung cancer immunotherapy. **Drug Discovery Today**, v. 00, p. 1-8, June, 2017.
- FALLARINO, F.; GROHMANN, U.; VACCA, C.; BIANCHI, R.; ORABONA, C.; SPRECA, A.; FIORETTI, M.C.; PUCETTI, P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. **Cell Death Differ**, v. 9, p. 1069-1077, 2002.
- FECCHIO, D; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, v. 14, n. 1, p. 125-132, February, 1990.

FERNANDES, P. A.; GUERRA, F.S.; VENDAS, N.M.; SARDELLA, T.B.; JANCAR, S.; NEVES, J.S. Characterization of the inflammatory response during ehrlich ascitic tumor development. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 71, p. 83-89, January-February, 2015.

GALANINA, N.; KLINE, J.; BISHOP, M.R. Emerging role of checkpoint blockade therapy in lymphoma. **Therapeutic Advances in Hematology**, v. 8 (2), p.81-90, February, 2017.

GROSSO, J.F.; KUNKEL-JURE, M. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. **Cancer Immunity Review**, v. 13, p. 5, January, 2013.

GUERRA, J. L. **Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores de Tumor de Ehrlich**. 1983. 87f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, 1983.

GROZDICS, E.; BERTA, L.; BAJNOK A.; VERES, G.; ILISZ, I.; KLIVÉNYI, P.; RIGÔ, J. JR.; VÉCSEI, L.; TULLASSAY, T.; TOLD, I. G. B7 costimulation and intracellular indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) expression in peripheral blood of healthy pregnant and non-pregnant women. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v.20, p. 1659-1665, September, 2014.

HAMMER, G.E.; MA, AVERII. Molecular control of steady-state dendritic cell maturation and immune homeostasis. **Annual Review of Immunology**, v. 31, p. 743–791, March, 2013.

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

HOLMGAARD, R.B.; ZAMARIN, D.; MUNN, D.H.; WOLCHOK, J.D.; ALLISON, J.P. Indoleamine 2, 3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210 (7), p. 1389-1402, July, 2013.

HRYNIEWICZ, A.; BOASSO, A.; EDGHILL-SMITH, Y.; VACARI, M.; FUCHS, D.; VENZON, D.; NACSA, J.; BETTS, M.R.; TSAI, W.P.; HERAUD, J.M.; BEER, B.; BLANSET, D.; CHOUGNET, C.; LOWY, I.; SHEARER, G.M.; FRANCHINI, G. CTLA-4 blockade decreases TGF- β , IDO, and viral RNA expression in tissues of SIVmac 251- infected macaques. **Blood**, v. 108 (12), p. 3834-3842, December, 2006.

HUANG, L.; BABAN, B.; JOHNSON, B.A.; MELLOR, A.L. Dendritic cells, indoleamine 2, 3 dioxygenase and acquired immune privilege. **International reviews of immunology**, v. 29(2), p.133–155, April, 2010.

HWU, P.; DU, M.X.; LAPOINTE, R; DO, M; TAYLOR, M. W; YOUNG, H.A. Indoleamine 2, 3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T-cells proliferation. **Journal the Immunology**, v.164, p. 3596-3599, April, 2000.

JÚNIOR, D. M.; ANTÔNIO, J.; ARAÚJO, P.; TIEKO, T.; CATELAN, T. Sistema imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 11, p. 552-580, 2010.

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

LEGÁNY, N.; BERTA, L.; KOVÁCS, L.; BALOG, A.; TOLDI, G. The role of B7 family costimulatory molecules and indoleamine 2, 3-dioxygenase in primary Sjögren's syndrome and systemic sclerosis. **Immunologic Research**, v. 65, p. 622-629, June, 2017.

MACKERN-OBERTI, J.P.; LLANOS, C.; VEGA, F.; SALAZAR-ONFRAY, F.; RIEDEL, C.A.; BUENO, S.M.; KALERGIS, A.M. Role of dendritic cells in the initiation, progress and modulation of systemic autoimmune diseases, **Autoimmunity Reviews**. v.14(2), p. 127-139, February, 2015.

MELLOR, A. Indoleamine 2, 3-dioxygenase and regulation of T cell immunity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 20-24, December, 2005.

MELLOR, A.L.; MUNN, D.H. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? **Immunology Today**, v. 20, n. 10, p. 469-473, October, 1999.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. IDO expression by dendritic cells: Tolerance and tryptophan catabolism. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 10, p. 762– 774, October, 2004.

MULLER, A.J., DUHADAWAY, J.B., DONOVER, P.S., SUTANTO-WARD, E., PRENDERGAST, G.C. Inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. **Nature Medicine**, v. 11, p. 312–319, March, 2005.

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-cells responses against indoleamine 2,3-dioxygenase. **PLOS ONE**, v. 7, p.1-12, April, 2012.

MUNN, D. H. Indoleamine 2, 3-dioxygenase, tumor-induce tolerance and counter regulation. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 2, p. 220-225, April, 2006.

MUNN, D. H.; SHAFIZADEH, E.; ATTWOOD, J. T.; BONDAREV, I.; PASHINE, A.; MELLOR, A. L. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 9, p. 1363-1372, May, 1999.

MUNN, D.H.; MELLOR, A.L. IDO in the tumor microenvironment: inflammation, counter-regulation, and tolerance. **Trends in Immunology**, v. 37, n. 3, p. 193-207, March, 2016.

MUNN, D.H.; MELLOR, A.L. Indoleamine 2, 3-dioxygenase and metabolic control of immune responses. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 3, p. 1-7, 2012.

MUNN, D.H.; MELLOR, A.L. Indoleamine 2, 3-dioxygenase and tolerance induced by tumors. **Journal of clinical investigation**, v. 117, p. 1147-1154, May, 2007.

MUNN, D.H.; SHARMA, M.D.; MELLOR, A.L. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v. 172-177, p. 4100-4110, April, 2004.

RIBAS, A.; COMIN-ANDUIX, B.; ECONOMOU, J.S.; DONAHUE, T.R.; DE LA ROCHA, P.; MORRIS, L.F.; JALIL, J.; DISSETTE, V.B.; SHINTAKU, I.P.; GLASPY, J.A.; GOMES-NAVARRO, J.; COCHRAN, A.J. Intratumoral immune cell infiltrates, Fox P3, and Indoleamine 2, 3-dioxygenase in patients with melanoma undergoing CTLA-4 blockade. **Clinical Cancer Research**, v. 15 (1), p. 390-9, January, 2009.

SILVA, A.E.; SANTOS, F.G.A.; CASSALI, G.D. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 58, n. 4, p. 658-661, 2006.

SEGURA, J.A.; BARBERO, L.G.; MÁRQUEZ, J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. **Immunology Letters**, v. 74, n. 2, p. 111-115, October, 2000.

TERNESS, P.; BAUER, T.M.; ROSE, L.; DUFTER, C.; WATZLIK, A.; SIMON, H.; OPELZ G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2, 3-dioxygenase expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 4, p. 447-457, August, 2002.

THÉATE, I.; VAN BAREN, N.; PILOTTE, L.; MOULIN, P.; LARRIEU, P.; RENAULD, J.C.; HERVÉ, C.; GUTIERREZ-ROELEN, I.; MARBAIX, E.; SEMPOUX, C.; VAN DEN EYNDE, B.J. Extensive profiling of the expression of the indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 protein in normal and tumoral human tissues. **Cancer Immunology Research**, v. 3 (2), p. 161-172, February, 2015.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**. 9. ed. São Paulo: Roca, 2014, p. 523.

TOSTI, G.; COCOROCCHIO, E.; PENNACCHIOLI, E. Anti-cytotoxic T lymphocyte antigen-4 antibodies in melanoma. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 6, p. 245-256, October, 2013.

TRABANELLI, S.; OCADLIKOVA, D.; EANGELIST, C.; PARISI, S.; CURTI, A. Induction of regulatory T Cells by dendritic cells through indoleamine 2,3-dioxygenase: a potent mechanism of acquired peripheral tolerance. **Current Medicinal Chemistry**, v.18, p. 2234-2239, 2011.

VALADARES, M.C.; KLEIN, S.I.; GUARALDO, A.M.A; QUEIROZ, M.L.S.
Enhancement of natural killer cell function by titanocenes in mice bearing Ehrlich ascites tumour. **European Journal of Pharmacology**, v. 473(2-3), p. 191-196, July, 2003.

VON RANGO, U. Fetal tolerance in human pregnancy - A crucial balance between acceptance and limitation of trophoblast invasion. **Immunology Letters**, v. 115, p. 21–32, January, 2008.

WEIHONG, L.; BIN, L.; WEI, F.; LIHONG, G.; XIAOHONG, L.; LEI, L.; ZHONGYING, H.; SHANGGEWEI, L. CTLA4 Ig transfer alleviates abortion in mice by expanding CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and inducing pulmonary indoleamine 2, 3-dioxygenase. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 80, p. 1-11, June, 2009.

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. **Procedures Natl Acadical Science U S A**, v. 83, p. 6622-6626, September, 1986.

YOSHIDA, R.; IMANISHI, J.; OKU, T.; KISHIDA, T.; HAYAISHI, O. Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by Interferon γ . **Procedures Natl Academical Science U S A**, v. 78, p. 129-132, January, 1981.

ZHAI, L.; LADOMERSKY, E.; DOSTAL, C.R.; LAUING, K.L.; SWOAP, K.; BILLINGHAM, L.K.; GRITSINA, G.; WU, M.; MCCUSKER, R.H.; BINDER, D.C.; WAINWRIGHT, D.A. Non-tumor cell IDO1 predominantly contribute to enzyme activity and response to CTLA-4/PD-L1 inhibition in mouse glioblastoma. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 62, p. 24-29, May, 2017.