



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Patologia



FREDERICO GUILHERME FREITAS LOBÃO RODRIGUES GOMES

Investigação da expressão de indoleamine 2,3-dioxigenase e suas correlações clínico-patológicas no melanoma uveal

Ribeirão Preto - SP
2022

FREDERICO GUILHERME FREITAS LOBÃO RODRIGUES GOMES

Investigação da expressão de indoleamine 2,3-dioxigenase e suas correlações clinicopatológicas no melanoma uveal

Versão Corrigida

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:
Patologia

Área de concentração:
Patologia Experimental

Orientador:
Prof. Dr. Fernando Chahud

Ribeirão Preto
2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP – Ribeirão Preto

GOMES, Frederico Guilherme Freitas Lobão Rodrigues

Investigação da expressão de indoleamine 2,3-dioxigenase e suas correlações clinicopatológicas no melanoma uveal.
Ribeirão Preto, 2022. 75p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia.
Orientador: Chahud, Fernando.

1. Melanoma Uveal. 2. Indoleamine 2,3-dioxigenase. 3. Câncer. 4. Microambiente tumoral. 5. Metástase.

Nome: GOMES, Frederico Guilherme Freitas Lobão Rodrigues Gomes

Título: Investigação da expressão de indoleamine 2,3-dioxigenase e suas correlações clinicopatológicas no melanoma uveal.

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em patologia experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor.

Banca Examinadora

Aprovado em:

Prof. Dr. Fernando Chahud

Instituição: FMRP/USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Alexandre Todorovic Fabro

Instituição: FMRP/USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Rodrigo Jorge

Instituição: FMRP/USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Luiz Antonio Gorla Marcomini

Instituição: UFSCar

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Adilson e Bete Gomes, por serem o alicerce de tudo que faço e me tornei, me dando força e resistência necessárias para seguir meus desejos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, *Adilson Rodrigues Gomes e Bete Gleibe Freitas Lobão Gomes*. Reconheço todos esforços feitos por mim, e sempre buscarei retribuir tamanha demonstração de amor. Foram vocês que me deram estrutura e orientaram caminhos para eu ir em busca dos meus objetivos e aspirações. A todas as formas de apoio recebidas, serei eternamente agradecido. E agradeço a todos os familiares que me apoiaram nas decisões que tomei.

Ao meu orientador Prof. *Dr. Fernando Chahud* pela oportunidade e pela confiança em mim depositada nestes anos para a realização deste trabalho, além de todo o apoio dado durante o desenvolvimento da pesquisa, ensinamentos transmitidos e por sempre estar disponível e disposto a auxiliar. Graças a oportunidade dada, pude encontrar novos conhecimentos fundamentais para minha vida acadêmica e profissional.

Ao *Programa de Patologia* por permitirem minha titulação nesta instituição de tamanho renome e respeito que é a Universidade de São Paulo.

Aos professores, *Dr. Edson Garcia, Dr. Fernando Ramalho, Dr. Luciano Neder, Dr. Alexandre Fabro, Dr. Leandra Ramalho, Dr. Simone Gusmão, Dra. Jorge Leon, Dr. Jorge Silvio Gutkind*, por disponibilizarem seus laboratórios e conhecimentos durante a realização de meu doutorado.

Aos *funcionários técnicos* da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo *em especial, Deisy Mara da Silva, Antonio de Padua Martins, Ana Carolina Veloni, Camila Zambonini Gimenes, Felipe Coelho, Lígia Santoro, Neide Gonçalves, Rosângela de Paiva, Ana Anselmi, Osmar, Junior, Décio e todos os outros funcionários do SERPAT* por todo apoio dado durante a execução de todo o trabalho, bem como pelos ouvidos amigos que as vezes foram necessários. Um agradecimento especial às técnicas *Elaine Floriano Medeiros e Deise Lucia Chesca* por todo apoio dado dentro e fora do laboratório, sem vocês esse trabalho não teria acontecido, serei eternamente grato por toda a ajuda!

Aos colegas de pós-graduação, *Carolline Mariano, Lucas Teixeira, Lucas dos Santos, Diogo Akio, João Victor da Silva, Julia Dietrichkeit, Sabrina Batah, Janaína Lelis, Bruna Rattis, Patrícia Pimenta, Fayla Carvalho, Cindy Sato e Letícia Fares*, por todos os bons momentos que passamos juntos, por tudo que aprendi com todos vocês, por toda a ajuda que tive no decorrer da minha pós-graduação.

Aos meus amigos de Ribeirão, um lugar que posso chamar de lar, *Bruno Andraus, Luis Fernando Godinho, Bianca Godinho, Maurício Floriano, Thaís Mantovani, Yara Dall'Acqua Marcelo Ramalho, Vanessa Risoleo, Pedro Iguatemy, Jonas Castilho, Silvia, Pedro Ruiz, Afonso Hernandez, Lucas Fragoso, Vitor Floriano e todos outros* que eventualmente posso não ter mencionado, por todas as alegrias e conversas compartilhadas, sem vocês, a vida seria menos divertida.

Aos meus amigos, que apesar da distância estão sempre perto: *Arthur Petrola Alencar, Maurício Abreu de Castro Figueiredo, Carlos André Frota Ximenez, Jorge Moura, Paulo Salim Daher Vasconcelos, Dorie Zattoni e Juliana Zardo* por todas os bons momentos, bons filmes, péssimos filmes, por todas as palhaçadas e por todas as noitadas que tivemos. Todos vocês, mesmo que de tão longe sempre foram

muito próximos e presentes em todas essas etapas da minha vida.

Agradecimento a agência de fomento: “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001” .

“A perfeição é inimiga
do perfeitamente adequado.”
James M. McGill

“Nada acontece a alguém
que a natureza não o tenha
preparado para aguentar!”
O Gladiador

RESUMO

GOMES, Frederico Guilherme Freitas Lobão Rodrigues. **Investigação da expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase e suas correlações clinicopatológicas no melanoma uveal.** 2022. 75f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022

O melanoma uveal é o câncer intraocular primário mais comum, e corresponde a 85% de todos os melanomas oculares, e até 50% dos pacientes desenvolvem doença metastática. Uma vez detectada a doença metastática, a sobrevida média dos pacientes acometidos é de 6 meses, na ausência de tratamento. Atualmente, não existe um tratamento que aumente a sobrevida global de forma efetiva, devido à alta resistência às terapias. Um dos mecanismos de resistência tumoral ao tratamento seria o microambiente tumoral imunossupressor. Por isso, torna-se necessária a realização de novos estudos que evidenciem fatores com valor preditivo e possibilidades terapêuticas. A enzima indoleamina-2,3 dioxigenase (IDO1) é expressa por alguns tipos celulares e também por células tumorais. A hipótese é que a IDO1 seja regulada pelo melanoma uveal que fornece um mecanismo de imunossupressão que esteja relacionado a um pior prognóstico e resistência aos tratamentos convencionais. A expressão imuno-histoquímica de IDO1 foi avaliada em amostras parafinadas de melanomas uveais provenientes do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e os achados foram correlacionados com as características morfológicas dos tumores e com a ocorrência de metástases/sobrevida dos pacientes. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a IDO1 é expressa apenas por células inflamatórias do microambiente tumoral em variados níveis. Foi observado que a alta densidade de células positivas para IDO1 no microambiente tumoral está associada ao desenvolvimento de metástases, mas não houve correlação com características morfológicas específicas da neoplasia. Esses resultados indicam que a IDO1 pode ser um dos mecanismos-chave para progressão tumoral e resistência às terapias.

Palavras-chave: Melanoma uveal; Indoleamina 2, 3-dioxigenase; Câncer; Microambiente tumoral; Metástase.

ABSTRACT

GOMES, Frederico Guilherme Freitas Lobão Rodrigues. **Investigation of the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and clinicopathological correlations in uveal melanoma.** 2022. 75f. Thesis (Doctorate in Experimental Pathology) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022

Uveal melanoma is the most common intraocular cancer, accounting for 85% of all ocular melanomas, and up to 50% of patients develop metastatic disease. Once metastatic disease is detected, the median overall survival of affected patients is 6 months in the absence of treatment. Currently, there is no effective treatment that increases overall survival, due to resistance to immunotherapies. One of the mechanisms of tumor resistance to treatment would be the immunosuppressive tumor microenvironment. Therefore, it is necessary to carry out new studies that relate those immunosuppressive factors with predictive value and therapeutic possibilities. The enzyme indoleamine-2,3 dioxygenase (IDO1) is expressed by some cell types and also by tumor cells. The hypothesis is that IDO1 is regulated by uveal melanoma, which provides an immunosuppressive environment that is related to a worse prognosis and resistance to conventional immunotherapies. The expression of IDO1 was evaluated in samples of uveal melanomas from the Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto and from the collection of the Department of Pathology of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, along with clinicopathological features. Therefore, histopathological and immunohistochemical evaluations were performed to characterize the expression of IDO1 in uveal melanomas. The results obtained in the present study suggest that IDO1 is expressed in different levels only by cells of the tumor microenvironment. It was observed that the high density of IDO1-positive cells in the tumor microenvironment is associated with the development of metastases, but not with other morphological characteristics of this neoplasm. These results indicate that IDO1 may be one of the key mechanisms for tumor progression and resistance to immunotherapies.

Keyword(s): Uveal melanoma, Indoleamine 2,3-Dioxygenase; Cancer; Tumor microenvironment; Metastasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – (A)Localização do gene codificador da enzima Indoleamine 2,3-Dioxigenase (IDO) no cromossomo 8, contendo 10 exons, totalizando 14.982bp (NM_002164); (B) Estrutura tridimensional da enzima IDO1 contendo 403 aminoácidos e peso molecular de 42 KDa.	23
Figura 2 – Placenta utilizada como controle positivo para o anticorpo anti-IDO1 (imunohistoquímica, magnificação 400X).....	32
Figura 3 - Placenta utilizada como controle positivo para o anticorpo anti-CD34 (Imunohistoquímica, magnificação: 400x)	34
Figura 4 - Cólon utilizado com controle positivo para o anticorpo anti-BAP1 (Imunohistoquímica, magnificação: 400X).....	35
Figura 5 - Distribuição da neoplasia de acordo com o sexo	37
Figura 6 - Distribuição da neoplasia por olho afetado	38
Figura 7 – Distribuição dos casos segunda faixa etária	39
Figura 8 – Distribuição segundo a localização da neoplasia	40
Figura 9 - Diferentes tipos histológicos do melanoma uveal. Fusiforme (A), Epitelióide (B) (H&E, magnificação 400X)	40
Figura 10 - Distribuição de acordo com tipo histológico	41
Figura 11 - Classificação por Tamanho (AJCC, 2017)	41
Figura 12 - Dimensões médias das neoplasias	42
Figura 13 - Integridade da membrana de Bruch	43
Figura 14 - Distribuição das metástases de acordo com sua localização	43
Figura 15 - Padrões de trama vascular do melanoma uveal. Normal (A), Silencioso (B), Arco incompleto (C), Arco com entroncamento e redes vasculares. (Magnificação de 200x)	44
Figura 16 - Distribuição de acordo com o padrão vascular	45
Figura 17 - Padrões de expressão da proteína BAP1 no melanoma uveal. Alta expressão (A) e baixa expressão (B) (Magnificação de 400x)	45
Figura 18 - Curva de evento de Kaplan-Meier para metástase de melanoma uveal nos grupos BAP1 high e BAP1 low.	46
Figura 19 - Expressão da proteína IDO1 no microambiente tumoral de melanomas uveais. (Magnificação de 200x).....	47
Figura 20 - Curva de evento de Kaplan-Meier para metástase de melanoma uveal nos grupos IDO1 high e IDO1 low.....	49
Figura 21 - Comparação da distribuição dos casos de melanoma uveal conforme a classificação da AJCC (em %)	51
Figura 22 - Distribuição dos Melanomas Uveais conforme expressão da proteína BAP1	53
Figura 23 - Comparação da distribuição entre alta e baixa densidade de células positivas para o marcador IDO e tamanho tumoral (AJCC)	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Expressão e prognóstico de IDO1 em diferentes tipos de câncer.....	25
Tabela 2 - Comparação de características clinico-patológicas entre baixa e alta densidade celular de IDO1	48

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	13
2 – REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 MELANOMA UVEAL	15
2.2. IMUNOTERAPIA NO CÂNCER.....	20
2.3 INDOLEAMINA 2,3-DIOXIGENASE	22
2.4 IDO1 COMO ALVO NA IMUNOTERAPIA.....	26
3. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	29
4. OBJETIVO	30
4.1. OBJETIVO GERAL	30
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5. MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	31
5.2 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA	31
5.3. IMUNO-HISTOQUÍMICA DE TUMORES PRIMÁRIOS	31
5.3.1 AVALIAÇÃO DA INDOLEAMINE 2,3-DIOXIGENASE.....	31
5.3.2 AVALIAÇÃO DA MICRODENSIDADE VASCULAR E PADRÕES VASCULARES	33
5.3.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BAP1.....	34
5.4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	35
6. RESULTADOS	37
7. DISCUSSÃO	50
8. CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXO	75
ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO CEP	75

1 - INTRODUÇÃO

Os melanócitos são células dendríticas produtoras de melanina, pigmento responsável pelas diferentes cores da pele, pelo e íris. O melanócito normal é derivado de melanoblastos da neuroectoderme que durante a embriogênese migram para a epiderme, derme, e outras localizações (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002), como a úvea (HU; SIMON; SARNA, 2008). Os melanossomos acumulados dentro do citoplasma dos ceratinócitos servem para proteger a pele contra os efeitos prejudiciais da radiação ultravioleta (CAMARGO; CONCEIÇÃO; COSTA, 2008). A síntese de melanina ocorre no interior dos melanossomos, organelas especializadas que possuem tirosinase ativa, enzima observada exclusivamente em melanócitos, a qual promove conversão da tirosina em melanina (BARNHILL; BOLOGNIA, 1995).

O melanoma é um tumor maligno que se desenvolve a partir da transformação maligna dos melanócitos (CHUDNOVSKY; KHAVARI; ADAMS, 2005; FEMIANO; LANZA; BUONAIUTO; GOMBOS *et al.*, 2008). Mesmo compreendendo somente 3% de todos os tumores malignos da pele, é responsável por 60% de todas as mortes por neoplasias cutâneas (KUPHAL; BOSSERHOFF, 2009). Embora a maior parte dos melanomas se desenvolvam na pele, eles também podem se desenvolver em mucosas ou em quaisquer localizações em que as células da crista neural tenham migrado (FEMIANO; LANZA; BUONAIUTO; GOMBOS *et al.*, 2008).

As lesões melanocíticas da área ocular compreendem um espectro de lesões que vão desde nevos benignos até o melanoma invasivo. As origens dessas lesões são os melanócitos conjuntivais e uveais, que, como sua contraparte cutânea, surgem de células da crista neural em desenvolvimento e do ectoderma sobrejacente (BADERCA; VINCZE; BALICA; SOLOVAN, 2014).

Em se tratando da úvea, os nevos da íris, do corpo ciliar e da coróide são encontrados em pelo menos 30% das pessoas, sem predileção por sexo. Eles são extremamente raros em crianças. Os nevos da íris ocorrem com incidência aumentada em pessoas com neurofibromatose (BADERCA; SOLOVAN; BOGHIAN, 2013).

Os melanomas podem se desenvolver em um dos vários sítios anatômicos do olho e seus anexos e são divididos em melanomas uveais, melanomas conjuntivais e

melanomas palpebrais. Dentre os melanomas oculares, a origem mais comum é na úvea, mais comumente na coroide (CHAR, D.M., 2001).

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MELANOMA UVEAL

O melanoma uveal representa a neoplasia maligna primária intraocular mais comum no adulto (JAGER; SHIELDS; CEBULLA; ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2020; KUJALA; MÄKITIE; KIVELÄ, 2003). No entanto, corresponde a apenas 3-5% de todos os casos de melanomas. Essa neoplasia pode se desenvolver ao longo de todo trato uveal, incluindo íris, coroide e corpo ciliar (POPOVIC; AHMED; DIGIOVANNI; SHIELDS, 2017). A localização mais comum dessa neoplasia é a coroide, correspondendo a 80-90% dos casos, seguida de 7-12% no corpo ciliar e 3-8% na íris (DAMATO; DAMATO, 2012; SHIELDS; KALIKI; FURUTA; MASHAYEKHI *et al.*, 2012). Em contraste ao melanoma cutâneo, o melanoma uveal tem mantido taxas de incidência estáveis por muitos anos (SIEGEL; MA; ZOU; JEMAL, 2014; SINGH; TURELL; TOPHAM, 2011).

A íris é a localização menos comum para melanomas uveais (SHIELDS; KALIKI; FURUTA; MASHAYEKHI *et al.*, 2012). Melanomas de íris e iridociliares geralmente apresentam baixo potencial metastático quando comparado aos melanomas uveais em outras localizações (SHIELDS; KALIKI; FURUTA; MASHAYEKHI *et al.*, 2012). Esses autores relataram as frequências de desenvolvimento de metástase de melanoma de íris: 3% em 5 anos, 5% em 10 anos, e 10% em 20 anos. Em relação ao melanoma de íris, a morte relacionada ao tumor, num período de 10 anos, ocorre em aproximadamente 5-10% dos pacientes, e essa frequência aumenta em neoplasias com mais de 4,0 mm de espessura (RAZZAQ, 2010). Noventa por cento dos melanomas de íris são lesões circunscritas discretas, com bom prognóstico (CONWAY; CHUA; QURESHI; BILLSON, 2001), enquanto o restante é caracterizado por lesões difusas ou em formato de anel com prognóstico ruim.

O melanoma de íris é frequentemente separado dos melanomas uveais posteriores (corpo ciliar e coróide) por causa de seu prognóstico mais favorável (KLAUBER; JENSEN; PRAUSE; KESSING, 2012; SHIELDS; KALIKI; FURUTA; MASHAYEKHI *et al.*, 2012). A mortalidade publicada de melanomas de íris varia de 0-11%, dependendo do tipo celular e de mutações genéticas (KLAUBER; JENSEN;

PRAUSE; KESSING, 2012; SHIELDS; RAMASUBRAMANIAN; GANGULY; MOHAN *et al.*, 2011). O comportamento menos agressivo dessa neoplasia é atribuído a menor quantidade de alterações genéticas, quando comparada a de melanomas uveais posteriores.

O diagnóstico clínico auxiliado por ultrassom demonstrou ter um elevado nível de precisão na identificação do melanoma (MUELLER; MANIOTIS; FREEMAN; BARTSCH *et al.*, 2002).

A biomicroscopia ultrassônica é particularmente útil para a avaliação do corpo ciliar e detecção de padrões microvasculares preditivos de crescimento tumoral. Estudos de tomografia computadorizada ou ressonância magnética são úteis para excluir extensão extraocular e são usadas para planejar radioterapia (CHAR; BOVE; PHILLIPS, 2003; DAMATO, 2006). Além disso, uma avaliação sistêmica é geralmente realizada quando do diagnóstico inicial para a avaliação de possível doença metastática.

A biópsia é geralmente indicada se outros testes falharam para elucidar o diagnóstico. A precisão do diagnóstico relatado varia dependendo do tamanho do tumor e localização (CHAR; MILLER, 1995), diâmetro de agulha, técnica de amostragem e de outros fatores. Com técnicas melhores, menos complicações e maior compreensão da importância da citogenética, alguns autores acreditam que essa análise será mais comum no futuro, especialmente se o perfil citogenético for utilizado no planejamento do tratamento (DAMATO, 2006). Para que tumores pequenos a medianos possam ser tratados de forma conservativa, a amostra para diagnóstico pode ser coletada por meio de citologia aspirativa por agulha fina transescleral, no momento ou antes do tratamento (SELLAM; DESJARDINS; BARNHILL; PLANCHER *et al.*, 2016). Outra possibilidade é a biópsia transvítrea realizada antes ou após a radioterapia (ANGI; KALIRAI; TAKTAK; HUSSAIN *et al.*, 2017).

As características clínicas e histopatológicas desses tumores, como o maior diâmetro basal, espessura, envolvimento do corpo ciliar, extensão extraocular, contagem de figuras de mitose, tipo celular, presença de alças vasculares têm sido relacionadas ao desenvolvimento de metástases (FOLBERG; RUMMELT; PARYS-VAN GINDERDEUREN; HWANG *et al.*, 1993; KUJALA; DAMATO; COUPLAND;

DESJARDINS *et al.*, 2013; MCLEAN; FOSTER; ZIMMERMAN; GAMEL, 1983; MCLEAN; FOSTER; ZIMMERMAN, 1977). A Sociedade Brasileira de Patologia (SBP) utiliza um sistema de classificação dos melanomas uveais baseados na metodologia utilizada pelo American Joint Committee for Cancer (KIVELA, SIMPSON; GROSSINKLAUS, 2016). Essa classificação é de grande importância para a avaliação de prognóstico e direcionamento da abordagem terapêutica.

As modalidades terapêuticas documentadas são ressecção cirúrgica (iridectomia, iridociclectomia e enucleação) e algumas modalidades de radioterapia (CHAR; MILLER; CRAWFORD, 2001; DOGRUSÖZ; JAGER; DAMATO, 2017; SHIELDS; KALIKI; HUTCHINSON; NICKERSON *et al.*, 2013), uma vez que é observado crescimento tumoral. Ambos os tratamentos possuem riscos, seja de indução de catarata, deficiência límbica (radioterapia) e excisão tumoral incompleta e recidiva (ressecção cirúrgica) (RAZZAQ, 2010; SHIELDS; KALIKI; FURUTA; MASHAYEKHI *et al.*, 2012; SHIELDS; KALIKI; HUTCHINSON; NICKERSON *et al.*, 2013).

Quanto aos melanomas de coroide e corpo ciliar, apesar do sucesso de 90% do tratamento local, pouco progresso foi obtido no aumento da sobrevivência dos pacientes nas últimas décadas (ALGAZI; TSAI; SHOUSHARI; MUNHOZ *et al.*, 2016; AUGSBURGER; CORRÊA; SHAIKH, 2009). Diferente dos melanomas de íris, essas neoplasias de origem na coroide e no corpo ciliar são mais agressivas e têm maior tendência a produzir metástases, causando morte (FURDOVA; STRMEN; WACZULIKOVA; CHORVATH *et al.*, 2012). Apesar dos melanomas uveais compartilharem de algumas características histológicas com o melanoma cutâneo (WEIS; SHAH; LAJOUS; SHIELDS *et al.*, 2006), eles diferem nos aspectos moleculares e patogênicos (ALGAZI; TSAI; SHOUSHARI; MUNHOZ *et al.*, 2016). Essas diferenças são compostas por uma série de anormalidades cromossômicas e alterações em genes (CARVAJAL; SCHWARTZ; TEZEL; MARR *et al.*, 2017).

A monossomia do cromossomo 3, perda de 1p, ganho de 1q, perda de 6q, ganho de 6p, perda de 8p e ganho de 8q são as anormalidades cromossômicas mais comuns no melanoma uveal (DAMATO; DOPIERALA; COUPLAND, 2010; HÖGLUND; GISSELSSON; HANSEN; WHITE *et al.*, 2004). A monossomia do cromossomo 3 foi observada em aproximadamente 50% dos tumores e é associada à doença metastática

(THOMAS; PÜTTER; WEBER; BORNFELD *et al.*, 2012). Alterações simultâneas nos cromossomos 3 e 8 estão associadas com pior prognóstico, enquanto resultados mais promissores são observados em pacientes com monossomia parcial do cromossomo 3 (CASSOUX; RODRIGUES; PLANCHER; ASSELAIN *et al.*, 2014; THOMAS; PÜTTER; WEBER; BORNFELD *et al.*, 2012).

As mutações nos proto-oncogenes GNAQ ou GNA11 são observadas em 80% dos melanomas uveais primários e estão associados com a ativação constitutiva das vias de sinalização de oncogenes como RAS/RAF/MEK/ERK (ONKEN; WORLEY; LONG; DUAN *et al.*, 2008; VAN RAAMSDONK; BEZROOKOVE; GREEN; BAUER *et al.*, 2009; VAN RAAMSDONK; GRIEWANK; CROSBY; GARRIDO *et al.*, 2010); levando à proliferação celular, crescimento tumoral e progressão (DAVIES; LOGIE; MCKAY; MARTIN *et al.*, 2007; ROBERTS; STINCHCOMBE, 2013). Mutações inativadoras do BAP1 aumentam o comportamento pró-metastático, por mecanismo ainda desconhecido (LANDREVILLE; AGAPOVA; MATATALL; KNEASS *et al.*, 2012). Algumas mutações estão associadas com um comportamento menos agressivo, como as dos genes SF3B1 e EIF1AX (HARBOUR; ROBERSON; ANBUNATHAN; ONKEN *et al.*, 2013; MARTIN; MAßHÖFER; TEMMING; RAHMANN *et al.*, 2013).

Como citado anteriormente, os melanomas de coroide e corpo ciliar têm maior tendência de produzir metástases, o que causa uma elevada taxa de mortalidade (CAMINAL; MEJIA-CASTILLO; ARIAS; CATALA *et al.*, 2013; SINGH; TURELL; TOPHAM, 2011). O fígado é o principal alvo de metástases (em aproximadamente 89%), seguido de pulmões (29%) e ossos (17%) (SINGH; TURELL; TOPHAM, 2011). Uma vez que a doença metastática esteja estabelecida, o prognóstico é ruim e a expectativa de vida é reduzida para 6 meses, na ausência de tratamento (MARIANI; PIPERNO-NEUMANN; SERVOIS; BERRY *et al.*, 2009; PONS; PLANA; CAMINAL; PERA *et al.*, 2011). O melanoma uveal metastático é refratário ao tratamento quimioterápico convencional, e tem resposta parcial em cerca de 5% a 15% dos casos (OLIVA; RULLAN; PIULATS, 2016). Não há evidência de que a quimioterapia convencional prolongue a sobrevivência, a qual permanece entre 6-10 meses, com apenas 15% dos pacientes estando vivos em 1 ano de tratamento (BUDER; GESIERICH; GELBRICH; GOEBELER, 2013; MARIANI; PIPERNO-NEUMANN;

SERVOIS; BERRY *et al.*, 2009; PONS; PLANA; CAMINAL; PERA *et al.*, 2011). Para os pacientes que desenvolvem doença metastática, ainda não existe um tratamento padrão. Dacarbazine, uma opção quimioterápica para o tratamento de melanoma cutâneo, tem sido utilizada para melanoma uveal, apesar das diferenças moleculares entre as doenças (DUMMER; HAUSCHILD; GUGGENHEIM; KEILHOLZ *et al.*, 2012; NATHAN; COHEN; COUPLAND; CURTIS *et al.*, 2015), e de sua atividade limitada no melanoma uveal (CARVAJAL; SOSMAN; QUEVEDO; MILHEM *et al.*, 2014). Outros protocolos quimioterápicos, incluindo temozolomida, cisplatina, treosulfan, fotemustina e várias combinações têm sido investigadas com resultados desapontadores (PEREIRA; ODASHIRO; LIM; MIYAMOTO *et al.*, 2013; POSTOW; KUK; BOGATCH; CARVAJAL, 2014; SPAGNOLO; GROSSO; PICASSO; TORNARI *et al.*, 2013). Levando isso em consideração, novas opções de tratamento adicional que sejam eficazes são muito necessárias.

Dentre as novas estratégias terapêuticas, o uso de um anticorpo monoclonal, Ipilimumab, que bloqueia o antígeno citotóxico associado ao linfócito T (CTLA-4), foi aprovado para uso nos Estados Unidos da América e Europa para o tratamento de melanomas não-ressecáveis em estado avançado (DUMMER; HAUSCHILD; GUGGENHEIM; KEILHOLZ *et al.*, 2012). No entanto, o Ipilimumab demonstrou atividade clínica limitada, e mediana de tempo de sobrevivência de 6,2 meses (ZIMMER; VAUBEL; MOHR; HAUSCHILD *et al.*, 2015). Anticorpos cujos alvos são receptor de morte celular programada 1 (PD-1) (Nivolumab e Pembrolizumab) e ligante de PD-1 (PD-L1) (atezolizumab) apresentaram-se como agentes revolucionários no tratamento de melanoma cutâneo (HODI; O'DAY; MCDERMOTT; WEBER *et al.*, 2010) e ótimas respostas em uma série de outras neoplasias (BRAHMER; RECKAMP; BAAS; CRINÒ *et al.*, 2015; GARON; RIZVI; HUI; LEIGHL *et al.*, 2015; MOSKOWITZ; RIBRAG; MICHOT; MARTINELLI *et al.*, 2014). No entanto, em relação aos melanomas uveais metastáticos, as respostas eficazes foram raras (ALGAZI; TSAI; SHOUSHARI; MUNHOZ *et al.*, 2016). Alternativas e combinações de tratamento foram estudadas atualmente, como inibidores de MEK1/2 (CARVAJAL; SCHWARTZ; MANN; SMITH *et al.*, 2015; INFANTE; FECHER; FALCHOOK; NALLAPAREDDY *et al.*, 2012; YEH; MARSH; BERNAT; BALLARD *et al.*, 2007), de AKT (AMBROSINI; MUSI; HO; DE

STANCHINA *et al.*, 2013; SARAIVA; CAISSIE; SEGAL; EDELSTEIN *et al.*, 2005), de tirosina quinase (ALL-ERICSSON; GIRNITA; MÜLLER-BRUNOTTE; BRODIN *et al.*, 2004), agentes antiangiogênicos (Bevacizumab e Cabozantinib)(PIPERNO-NEUMANN; DIALLO; ETIENNE-GRIMALDI; BIDARD *et al.*, 2016; YAKES; CHEN; TAN; YAMAGUCHI *et al.*, 2011; YANG; JAGER; GROSSNIKLAUS, 2010).

As células de melanoma uveal conseguem fazer evasão do sistema imune, através de uma série de mecanismos que inibem as respostas inata e adaptativa (OLIVA; RULLAN; PIULATS, 2016). A partir do conhecimento desses processos, novas modalidades terapêuticas de imunoterapia podem ser exploradas, como inibição da expressão da Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), uma enzima que provoca a depleção de triptofano inviabilizando a proliferação de linfócitos e de células *natural-killer* e macrófagos (MUNN; MELLOR, 2007).

2.2. IMUNOTERAPIA NO CÂNCER

Uma das primeiras descrições de imunoterapia do câncer foi publicada em uma série de casos de 1893 pelo cirurgião de Nova York, William Coley (DUNN-PIRIO; VLAHOVIC, 2017). Depois de observar um sarcoma desaparecer em um paciente que desenvolveu erisipela, o Dr. Coley teorizou que as infecções pós-operatórias podem ajudar a combater o câncer. Ele então inoculou os pacientes que apresentavam sarcoma inoperável com estreptococo morto e notou o encolhimento do tumor. No entanto, a imunoterapia contra o câncer não foi seriamente processada por muitos anos e só ressurgiu com a compreensão moderna do sistema imune inato e adaptativo ~~fe~~ alcançada. A noção de imunovigilância do câncer foi inicialmente exposta por Burnet e Thomas na década de 1950, mas fortes evidências de apoio não estavam disponíveis até a década de 1990, após experimentos demonstrarem que o IFN- γ era protetor contra tumores (DUNN; BRUCE; IKEDA; OLD *et al.*, 2002).

Em 2010, a primeira vacina terapêutica contra o câncer, Sipuleucel-T (Dendreon Corporation, Seattle, Washington), foi aprovada pelo FDA para o tratamento de câncer de próstata metastático resistente à castração após um estudo demonstrar que prolongou a sobrevida mediana em 4,1 meses (TANIMOTO; HORI; KAMI, 2010). Vários

anos depois, uma outra forma de imunoterapia, conhecida como acopladores biespecíficos de células T (BiTEs), foi aprovada para o tratamento de leucemia linfoblástica aguda (LLA) recidivante e refratária. Essa droga, o blinatumomabe, é um anticorpo monoclonal que liga as células T citotóxicas às células B malignas, resultando na destruição dessas células B (TOPP; GÖKBUGET; ZUGMAIER; KLAPPERS *et al.*, 2014).

Atualmente, os agentes que inibem os *checkpoints* imunológicos contribuíram muito para o tratamento do câncer, principalmente para o melanoma maligno da pele, o câncer de pulmão avançado, o carcinoma de células renais e o carcinoma urotelial (DUNN-PIRIO; VLAHOVIC, 2017). O ipilimumab, um anticorpo monoclonal humanizado contra o antígeno associado aos linfócitos T citotóxicos (CTLA4), recebeu aprovação da FDA em 2011 para o tratamento de melanoma avançado após um estudo de fase 3 demonstrar benefício na sobrevida. Naquele estudo, pacientes com melanoma que haviam recebido um protocolo terapêutico prévio tiveram sobrevida geral (OS) de 10 meses após a infusão de ipilimumab, em comparação com 6,4 meses em pacientes que receberam uma vacina de glicoproteína-100 peptídeo (HODI; O'DAY; MCDERMOTT; WEBER *et al.*, 2010).

Em 2014, dois outros inibidores de ponto de checagem, pembrolizumab seguido de nivolumabe, receberam aprovação acelerada da FDA para o melanoma metastático. Estes anticorpos monoclonais inibem a proteína 1 de morte celular programada (PD-1). Uma pesquisa recente demonstrou a segurança e eficácia da combinação de ipilimumab com nivolumab para pacientes com melanoma avançado que não tinham a mutação de valina proto-oncogênica BRAf no códon 600 (mutação V600)(HODI; POSTOW; CHESNEY; PAVLICK *et al.*, 2015).

Em 2015, o FDA expandiu a indicação do nivolumabe para incluir o tratamento de metástases do câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC) com base nos resultados de dois estudos separados que demonstraram eficácia (BORGHAEI; PAZ-ARES; HORN; SPIGEL *et al.*, 2015; BRAHMER; RECKAMP; BAAS; CRINÒ *et al.*, 2015). Em outubro de 2015, o FDA autorizou o uso de pembrolizumab para pacientes com NSCLC avançado que expressou PD-L1. Essa decisão resultou de uma expansão dose-resposta de fase 1 de um estudo maior (KEYNOTE-001) no qual a taxa de

resposta com pembrolizumab foi de 41% em um subgrupo de 61 pacientes que tinham NSCLC avançado pré-tratado, PD-L1 positivo (GARON; RIZVI; HUI; LEIGHL *et al.*, 2015). Além disso, em novembro de 2015, o nivolumab foi aprovado pelo FDA para o tratamento de carcinoma de células renais avançado. Essa decisão foi tomada após um estudo randomizado e aberto ter demonstrado maior eficiência do nivolumab em relação ao everolimus, em pacientes que tiveram câncer renal metastático e que falharam previamente na terapia antiangiogênica (MOTZER; ESCUDIER; GEORGE; HAMMERS *et al.*, 2020; MOTZER; ESCUDIER; MCDERMOTT; GEORGE *et al.*, 2015). Finalmente, em maio de 2016, o primeiro inibidor da PD-L1, atezolizumab, foi aprovado para o tratamento do carcinoma urotelial.

Os vírus oncolíticos (OVs) pertencem a uma quarta classe de imunoterapias anticâncer que conseguiram obter autorização do FDA. Talimogene laherparepvec, um vírus geneticamente modificado derivado do herpes simplex vírico tipo 1 (HSV1), foi desenvolvido para tratar o melanoma avançado. Este vírus não só infecta seletivamente as células de melanoma, mas é geneticamente modificado para transportar o gene do fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos, o que reforça a ação do sistema imunológico. O estudo de fase 3, randomizado e aberto, responsável pela aprovação do talimogene laherparepvec no FDA, demonstrou uma taxa de resposta de 26,4% em comparação com 5,7% no grupo controle (ANDTBACKA; KAUFMAN; COLLICHIO; AMATRUDA *et al.*, 2015).

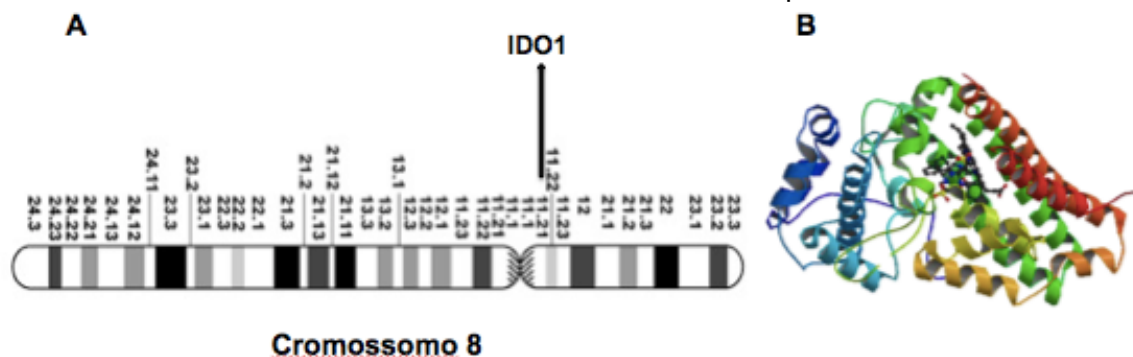
2.3 INDOLEAMINA 2,3-DIOXIGENASE

As oxigenases são enzimas contendo metais que catalisam a incorporação de uma molécula de oxigênio (O_2) dentro do substrato, e isso leva a um modelo no metabolismo e síntese de uma variedade de substâncias biológicas. Dois tipos de oxigenases são conhecidos: monooxigenases e dioxigenases (MUNN; MELLOR, 2013).

A enzima indoleamina 2, 3-dioxigenase (IDO1) (Figura 1) fornece o passo inicial da taxa limitante para o catabolismo de triptofano e quinurenina. As células T necessitam de triptofano para expansão clonal e proliferação, ou seja, a depleção de triptofano pela IDO1 reduz a resposta imune mediada por células T (FRUMENTO;

ROTONDO; TONETTI; DAMONTE *et al.*, 2002; MELLOR; CHANDLER; LEE; JOHNSON *et al.*, 2002; TERNESS; BAUER; RÖSE; DUFTER *et al.*, 2002). A regulação positiva da expressão de IDO1 é mediada por sinais pró-inflamatórios provenientes de endotoxinas microbianas e por interferon gama (IFN- γ) (TAKIKAWA; HABARA-OHKUBO; YOSHIDA, 1991). A imunorregulação e imunossupressão mediada pela IDO1 participa de: 1) controle das infecções microbianas (DÄUBENER; MACKENZIE, 1999), 2) sobrevivência prolongada de enxertos (Hainz *et al.*, 2007), 3) atenuar a inflamação autoimune (ALEXANDER; CRAWFORD; BERTERA; RUDERT *et al.*, 2002; HAYASHI; BECK; ROSSETTO; GONG *et al.*, 2004; PLATTEN; HO; YOUSSEF; FONTOURA *et al.*, 2005), e 4) prover a um ambiente imunológico apropriado na interface materno-fetal durante a gravidez (MUNN; ZHOU; ATTWOOD; BONDAREV *et al.*, 1998). Células do trofoblasto e células apresentadoras de antígenos produzem IDO1, o que previne as células T maternas de rejeitarem o feto (BABAN; CHANDLER; MCCOOL; MARSHALL *et al.*, 2004; HÖNIG; RIEGER; KAPP; SÜTTERLIN *et al.*, 2004).

Figura 1 – (A) Localização do gene codificador da enzima Indoleamine 2,3-Dioxigenase (IDO) no cromossomo 8, contendo 10 exons, totalizando 14.982bp (NM_002164); (B) Estrutura tridimensional da enzima IDO1 contendo 403 aminoácidos e peso molecular de 42 KDa.



Fonte: GOMES, F.G.F.L.R. (2022) adaptado de (WANG; SUN; DONG; WU *et al.*, 2019)

(WANG; SUN; DONG; WU *et al.*, 2019) Estudos iniciais determinaram que a expressão de IDO1 no olho ocorre na retina, íris/corpo ciliar, cristalino, e córnea (MALINA; MARTIN, 1993). Esta enzima desempenha dois papéis importantes na proteção do olho contra os danos causados pela luz ultravioleta. Em primeiro lugar, a IDO1 funciona como uma enzima antioxidante que limita a formação de espécies reativas de oxigênio intracelular (BODAGHI; GOUREAU; ZIPETO; LAURENT *et al.*, 1999; MALINA; MARTIN, 1993) e, em segundo lugar, a IDO1 é responsável pela

produção de filtros UV com triptofano que protegem a córnea e a retina de danos foto-oxidativos induzidos por UV (ultravioleta) (TAKIKAWA; TAGAWA; IWAKURA; YOSHIDA *et al.*, 1999). Foi formulada a hipótese de que a expressão de IDO1 pelas células endoteliais da córnea estenderia a sobrevivência dos aloenxertos corneanos inibindo a rejeição mediada por células T. As células endoteliais corneanas transfectadas para super expressar a IDO1 suprimiram a proliferação de células T e prolongaram significativamente a sobrevivência de aloenxertos, sugerindo que a expressão de IDO1 pelos tecidos oculares pode funcionar como um mecanismo que bloqueia as respostas imunitárias das células T. (BEUTELSPACHER; PILLAI; WATSON; TAN *et al.*, 2006).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar como a expressão de IDO1 pode favorecer o crescimento e sobrevivência tumoral. As propriedades imunossupressoras descritas anteriormente podem proteger o tumor da destruição mediada por células T, seja no ambiente tumoral ou em linfonodos que drenam a região tumoral. Recentemente, o papel da IDO1 na resistência tumoral foi demonstrado em modelo animal de camundongo (HOLMGAARD; ZAMARIN; MUNN; WOLCHOK *et al.*, 2013). Nesse modelo, foram inibidas a IDO1 e CTLA-4 de forma sinérgica para induzir a rejeição mediada por células T de células tumorais IDO(+) e IDO(-), ressaltando o efeito imunossupressor da expressão dessa enzima em células não-cancerígenas do estroma tumoral. Além disso, a IDO1 também pode atuar favorecendo o tumor através de mecanismos não-imunológicos; quinurenina derivada de triptofano demonstrou promover a sobrevivência e motilidade tumoral pela ativação do receptor de hidrocarbonetos aromáticos (PLATTEN; WICK; VAN DEN EYNDE, 2012). Outro trabalho recente associou a expressão de IDO1 como mediador inflamatório para neovascularização. Neste estudo (MONDAL; SMITH; DUHADAWAY; SUTANTO-WARD *et al.*, 2016) foram utilizados modelos animais murinos de metástase pulmonar e de retinopatia da prematuridade. Esses animais tinham o controle com expressão de IDO1 e camundongos com a expressão dessa enzima inibida. Os resultados mostraram que, em ambos os casos, a neovascularização foi reduzida nos animais sem expressão da IDO, quando comparados aos tipo selvagem. A expressão de IDO1 por tumores imunogênicos em murinos inibiu a rejeição tumoral impedindo o estabelecimento de expansão e diferenciação de células T específicas (UYTTENHOVE; PILOTTE;

THÉATE; STROOBANT *et al.*, 2003). A rejeição tumoral foi parcialmente restaurada quando os camundongos foram tratados com o inibidor de IDO1 (1-metil DL-triptofano).

A tabela 1 mostra a relação entre a expressão da IDO1 com prognóstico em diferentes neoplasias em humanos.

Tabela 1 - Expressão e prognóstico de IDO1 em diferentes tipos de câncer

Relação entre expressão de IDO1 no câncer e prognóstico			
Câncer	Expressão/Atividade da IDO	Prognóstico	Referência
Leucemia Mielóide Aguda	Aumento da taxa sérica Kyn/L-Trp	Aumento da atividade de IDO1 está relacionada a diminuição de sobrevivência	(CORM; BERTHON; IMBENOTTE; BIGGIO <i>et al.</i> , 2009)
Melanoma Cutâneo	Expressão em todas as neoplasias e linfonodos	IDO aumentada correlaciona-se com progressão do câncer e metástase	(POLAK; BORTHWICK; GABRIEL; JOHNSON <i>et al.</i> , 2007)
Glioma	Expressão de mRNA e produção da proteína em todos os tumores	Alta expressão de IDO1 está associada a malignidade e baixa sobrevivência	(MITSUKA; KAWATAKI; SATOH; ASAHARA <i>et al.</i> , 2013)
Linfoma de Hodgkin	IDO presente em histiócitos, células dendríticas e endoteliais	IDO associada infecção com vírus Epstein-Barr, prognóstico ruim e baixa sobrevivência	(CHOE; YUN; JEON; KIM <i>et al.</i> , 2014)
Linfoma não-Hodgkin	Expressão de mRNA e produção de proteína em alguns tumores	Alta expressão de IDO1 relacionada a tumores maiores, menor remissão e taxas de sobrevivência mais curtas	(LIU; LU; FENG; DING <i>et al.</i> , 2014)
Carcinoma Hepatocelular	Expressão de mRNA e produção de proteína em alguns tumores	Expressão de IDO1 é um fator independente de prognóstico relacionado com redução da sobrevivência global e taxa de sobrevivência inferior a 5 anos.	(PAN; WANG; CHEN; ZHANG <i>et al.</i> , 2008)
Melanoma Cutâneo	Proteína presente em linfonodos sentinelas; Presente em algumas células tumorais e células endoteliais peritumorais	Expressão peritumoral de IDO1 em células endoteliais é um fator prognóstico pior para sobrevivência e reincidência.	(CHEVOLET; SPEECKAERT; HASPELAGH; NEYNS <i>et al.</i> , 2014; LEE; DALTON; MESSINA; SHARMA <i>et al.</i> , 2003)
Leucemia/Linfoma de Células T	Expressão de IDO1 em algumas células tumorais e não tumorais; aumento da taxa sérica de Kyn/L-Trp	Altos níveis séricos de Kyn é um fator prognóstico pior, particularmente em pacientes com variantes mais agressivas.	(MASAKI; ISHIDA; MAEDA; SUZUKI <i>et al.</i> , 2015)
Melanoma Uveal	Expressão da IDO1 em algumas células tumorais e não tumorais	Grupos com alta ou baixa expressão não apresentaram diferenças em relação a prognóstico.	(LIANG; PENG; ZENG; ZHAO <i>et al.</i> , 2019; STÅLHAMMAR; SEREGARD; GROSSNIKLAUS, 2019)

Fonte: GOMES, F.G.F.L.R. (2022)

Ao contrário das células de melanoma da pele (citadas anteriormente), que são excelentes para induzir respostas de células T alogênicas (HAANEN; BAARS; GOMEZ;

WEDER *et al.*, 2006), as células de melanoma uveal, primárias e metastáticas, são pobres estimuladores da proliferação de linfócitos alogênicos (VERBIK; MURRAY; TRAN; KSANDER, 1997), sugerindo que as células de melanoma uveal geram um microambiente local que não suporta expansão de linfócitos T específicos. Desta forma, a expressão de IDO1 pelos melanomas uveais pode afetar profundamente as estratégias imunoterapêuticas baseadas em células T e IFN- γ .

Independente do seu potencial catalítico, a IDO1 demonstrou, em modelos experimentais que atua como molécula sinalizadora para a supressão imunológica mediada por TGF- β (PALLOTTA; ORABONA; VOLPI; VACCA *et al.*, 2011). Essas constatações fornecem uma boa razão para o desenvolvimento de estudos clínicos que tenham objetivo de inibir a IDO1, e sua atividade catalítica, associando, ou não, com outras formas de tratamento (LIU; SHIN; KOBLISH; YANG *et al.*, 2010). Com o aumento do acesso às novas tecnologias como nanotecnologia, novos produtos inibidores de IDO1 específicos para células tumorais e do microambiente tumoral serão desenvolvidas. O inibidor de IDO1 ideal deve fornecer tratamento efetivo quando combinado com outras modalidades terapêuticas (ZULFIQAR; MAHROO; NASIR; FAROOQ *et al.*, 2017).

2.4 IDO1 COMO ALVO NA IMUNOTERAPIA

Atualmente, quatro inibidores de IDO1 estão sob desenvolvimento clínico: INCB024360 (Incyte) (KOBLISH; HANSBURY; BOWMAN; YANG *et al.*, 2010; LIU; SHIN; KOBLISH; YANG *et al.*, 2010), indoximod (D-1MT; NewLink Genetics), uma vacina de peptídeo IDO1 (Universidade de Copenhagen) (IVERSEN; ENGELL-NOERREGAARD; ELLEBAEK; ANDERSEN *et al.*, 2014), e NLG919 (NewLink Genetics, recentemente licenciado para a Genentech)(MAUTINO; JAIPURI; WALDO; KUMAR *et al.*, 2013).

O INCB024360 é um inibidor de molécula pequena de hidroxiamidina administrado por via oral. Os resultados de um estudo de fase I deste inibidor de IDO1 foram relatados durante uma sessão de discussão de pôster na reunião anual da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) de 2013 (BEATTY; O'DWYER; CLARK; SHI *et al.*, 2017). O estudo realizou tratamento com ≥ 300 mg de INCB024360,

duas vezes por dia, resultou em mais de 90% de inibição da atividade de IDO1 e a droga foi bem tolerada. O composto levou à doença estável por mais de 8 semanas em aproximadamente 30% desses pacientes com doença altamente refratária; metade dos pacientes tinha câncer colorretal refratário à maioria das abordagens imunoterápicas. Em conjunto, estes resultados sugerem que o INCB024360 tem o potencial para ser eficaz como monoterapia, mas, uma vez que foi tão bem tolerado, pode ser particularmente útil em combinação com outros agentes de terapêuticos contra câncer.

O indoximod (NLG2101), que é D-1MT, é um inibidor da via IDO1 administrado por via oral. Um estudo inicial da fase I do indoximod como agente único demonstrou uma boa biodisponibilidade oral e um perfil de segurança favorável (JACKSON; DEES; KAUH; HARVEY *et al.*, 2013). Com base nesses achados, um estudo de fase Ib do indoximod em combinação com docetaxel (NCT01191216) foi conduzido em 27 pacientes; os resultados foram relatados na reunião anual da ASCO em 2013 (JACKSON; DEES; KAUH; HARVEY *et al.*, 2013). Os dados mostraram que entre 22 pacientes avaliáveis, 18% (4/22; 2 com câncer de mama; 1, NSCLC; 1, câncer de timo) exibiram uma resposta parcial e 41% (9/22; 4 com câncer de mama; 2, NSCLC; 1, câncer de laringe; 1, câncer de esôfago; 1, câncer de ovário) tinha doença estável. Os dados indicaram que a terapia combinada foi bem tolerada, sem aumento nas toxicidades acima daquelas esperadas para os agentes individuais e sem interações medicamentosas inesperadas. Além disso, o perfil farmacocinético da terapia combinada foi semelhante ao perfil de cada droga como agente único. Com base nesses resultados, um estudo randomizado de fase II foi iniciado para avaliar o potencial de indoximod em combinação com docetaxel em pacientes com câncer de mama metastático (NCT01792050).

O indoximod também está sendo testado em combinação com outras imunoterapias, como uma vacina contra o câncer ou um inibidor de checkpoint imune. Primeiro, um estudo de fase Ib da combinação de indoximod e DC vacina contra o câncer (AD.p53DC) foi apresentado na reunião anual da ASCO em 2013 (JACKSON; DEES; KAUH; HARVEY *et al.*, 2013).

Uma segunda combinação de indoximod com imunoterapia - um estudo randomizado, duplo-cego, fase II de indoximod ou placebo após a infusão de

sipuleucel-T está sendo realizado em homens com câncer de próstata metastático resistente à castração, assintomático ou minimamente sintomático (NCT01560923). Finalmente, outra fase Ib / II estudo de indoximod combinada e ipilimumab está recrutando pacientes com melanoma (NCT02073123).

Dados de um ensaio fase I de uma vacina peptídica IDO1 em 15 pacientes positivos para HLA-A2 com NSCLC estágio III-IV foram publicados recentemente (IVERSEN, 2013). A vacina foi bem tolerada, sem toxicidade grave. Um paciente desenvolveu uma resposta parcial e 6 pacientes (40%) demonstraram doença estável por $\geq 8,5$ meses. Entretanto, está em curso um estudo de fase Ib da vacina combinada de péptidos IDO1 e temozolomida (NCT01543464).

O NLG919 é o inibidor oral da IDO1 mais recentemente desenvolvido (MAUTINO; JAIPURI; WALDO; KUMAR *et al.*, 2013). Foi desenvolvido pela mesma empresa que desenvolveu o indoximod. No ensaio pré-clínico, o NLG919 mostrou ser tão eficaz quanto o indoximod em aumentar a sobrevida em camundongos com glioblastoma e era sinérgico quando combinado com a quimiorradioterapia padrão (LI; BOLDUC; HODA; GAMBLE *et al.*, 2014). Com base neste achado pré-clínico, um estudo de escalonamento de dose de fase I está recrutando pacientes com tumores sólidos avançados (NCT02048709).

3. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

O melanoma uveal é a neoplasia intraocular primária mais comum no homem, e tem uma alta propensão a provocar metástases tardias em órgãos como o fígado. Apesar de existirem tratamentos muito bem estabelecidos para a doença primária, uma vez que essa neoplasia dá origem a metástases não existe uma terapia com eficácia que aumente a sobrevida geral dos pacientes.

O desenvolvimento de inibidores de *checkpoints* imunológicos revolucionou o tratamento de melanoma cutâneo, nos últimos anos (CARVAJAL; PIPERNO-NEUMANN; KAPITEIJN; CHAPMAN *et al.*, 2018; SCHINZARI; ROSSI; CASSANO; DADDUZIO *et al.*, 2017). Entretanto, o melanoma uveal metastático costuma ser resistente a esse tipo de terapia (ALGAZI; TSAI; SHOUSHARI; MUNHOZ *et al.*, 2016), com poucos resultados promissores (PIULATS; ESPINOSA; DE LA CRUZ MERINO; VARELA *et al.*, 2021; ROSSI; PAGLIARA; ORTESCHI; DOSA *et al.*, 2019). A IDO1 é expressa em diversos tumores e pode contribuir para a resistência tumoral à terapia com inibidores de *checkpoints* imunológicos. Rossi e colaboradores (ROSSI; ZIZZARI; DI FILIPPO; ACAMPORA *et al.*, 2021) observaram níveis séricos elevados de HVEM, IL-8 e IDO1 em pacientes com melanoma uveal metastático quando comparado a pacientes com doença metastática do melanoma cutâneo. Nossa hipótese é de que a IDO1 expressa pelo melanoma uveal ou em seu microambiente tumoral, contribua para a progressão da doença e possa ser estabelecida como *checkpoint* imunológico.

4. OBJETIVO

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase, por técnica de imuno-histoquímica, em olhos enucleados com melanoma uveal, diagnosticados no Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a frequência de expressão de IDO 1 em células de melanoma uveal;
2. Avaliar a frequência de expressão de IDO 1 em células do microambiente tumoral;
3. Correlacionar a expressão de IDO1 com as características morfológicas dos tumores e a ocorrência de metástases e sobrevida dos pacientes.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram avaliadas 35 amostras de melanomas uveais de olhos enucleados obtidas do Serviço de Patologia (SERPAT) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), no período de 1993 a 2020.

Dados dos pacientes relevantes para o estudo foram analisados quando presentes nos prontuários: sexo, idade ao diagnóstico, cor da pele, olho afetado, localização e dimensões da lesão, presença e localização de metástases, tempo de sobrevida global e livre de progressão, e, quando existentes, modalidade de tratamento e evolução. A ausência de algum desses dados foi utilizada como critério de exclusão.

5.2 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA

Foram avaliadas as características macroscópicas da lesão como: tamanho (maior diâmetro de base e espessura), localização (coroide, corpo ciliar ou íris). Cortes histológicos dos tumores corados pela hematoxilina e eosina (H&E) e Ácido Periódico de Shiff foram analisados para o estudo morfológico dos padrões celulares e de arquitetura da dos vasos sanguíneos.

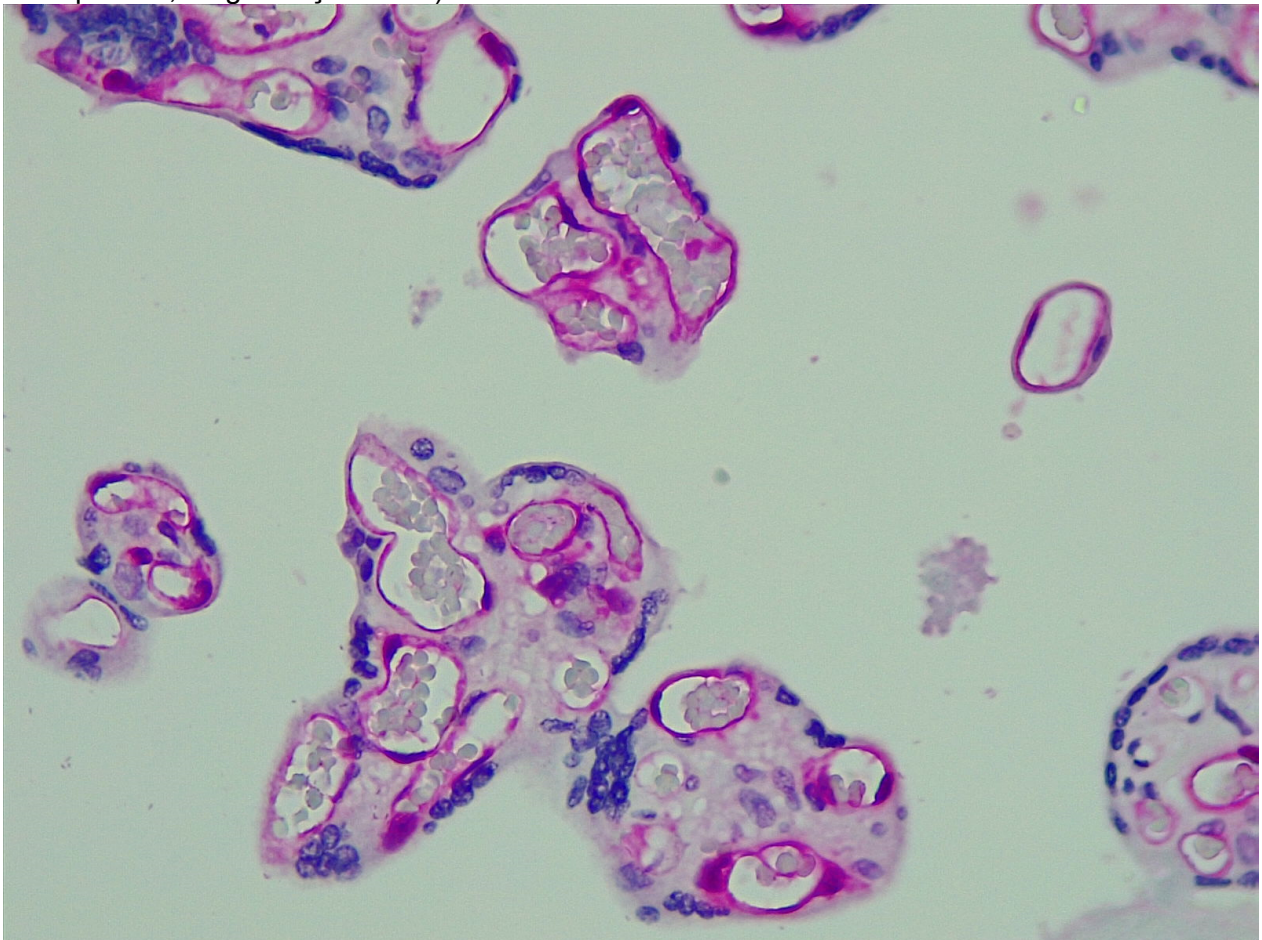
5.3. IMUNO-HISTOQUÍMICA DE TUMORES PRIMÁRIOS

5.3.1 AVALIAÇÃO DA INDOLEAMINE 2,3-DIOXIGENASE

Foram preparados cortes de parafina com 4µm de espessura, em seguida, as amostras foram incubadas em anticorpo policlonal de coelho anti-IDO (diluição 1:200; ab106134; Abcam). A reação de imuno-histoquímica foi realizada por meio do protocolo do kit Envision/HRP, Red Substrate Sys-Omnis, substrate buffer, Target Retrieval

Solution, Low pH (50x Citrate buffer, pH 6)(Dako Omnis, Denmark). Para facilitar a avaliação da imunorreação de tumores fortemente pigmentados, foi feita uma contra-coloração com Giemsa, a fim de distinguir a melanina da marcação com o substrato vermelho (Red Substrate Sys-Omnis). Como controle externo, foi utilizada placenta humana que apresenta positividade para IDO1 no endotélio dos vasos das vilosidades placentárias (figura 2). Para a avaliação da densidade celular positiva para IDO1+, foi utilizada a metodologia previamente descrita (STÅLHAMMAR; SEREGARD; GROSSNIKLAUS, 2019). O tecido foi avaliado no aumento de 40x em busca das áreas com a marcação mais intensa, também chamadas *hot spots*. Em seguida, o número de células positivas foi contado em 3 campos de grande aumento (400x), tendo a área agregada total de 0,6mm². O resultado final foi expresso em células/mm².

Figura 2 – Placenta utilizada como controle positivo para o anticorpo anti-IDO1 (imunohistoquímica, magnificação 400X)

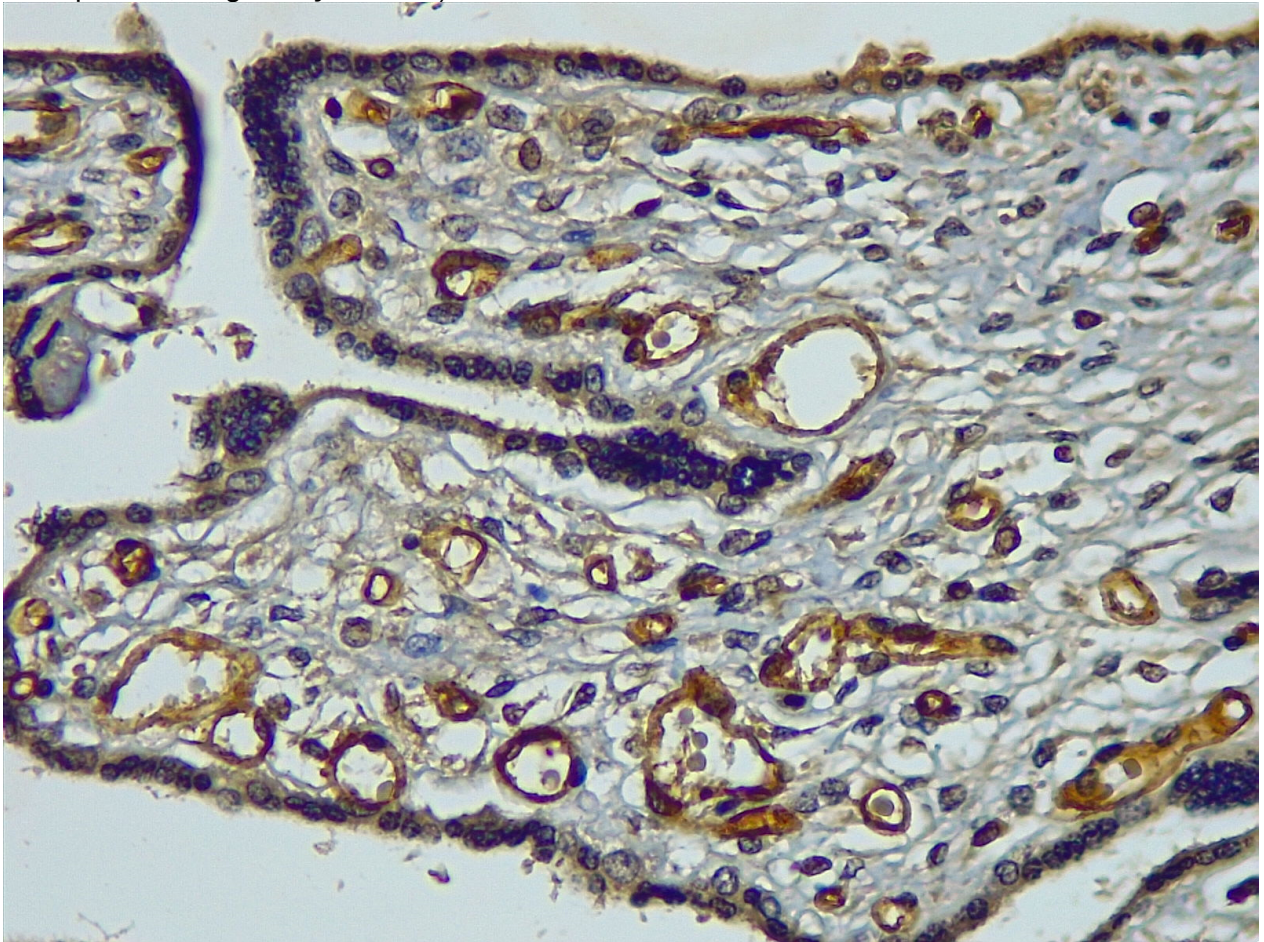


Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

5.3.2 AVALIAÇÃO DA MICRODENSIDADE VASCULAR E PADRÕES VASCULARES

Foram preparados cortes de parafina de 4µm de espessura, em seguida, as amostras foram incubadas em anticorpo policlonal CD34 (diluição 1:200; clone sc-7045; Santa Cruz). A reação de imuno-histoquímica foi realizada por meio do protocolo do kit Novolink Max Polymer DS (Leica Biosystems; Newcastle-upon-Tyne; United Kingdom). Para facilitar a avaliação da imunorreação de tumores fortemente pigmentados, foi feita uma contra-coloração com Giemsa, a fim de distinguir a melanina da marcação com o diaminobenzidina (DAB). Os microvasos foram contados a partir de três áreas densamente vascularizadas (“*hot spots*”), de acordo com a metodologia utilizada por (FOSS; ALEXANDER; HUNGERFORD; HARRIS *et al.*, 1997; FOSS; ALEXANDER; JEFFERIES; HUNGERFORD *et al.*, 1996). Depois de identificadas essas áreas, os microvasos foram contados no aumento de 200x (WK 10x/20L-H; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). A definição utilizada para redes microvasculares consiste da junção de, pelo menos, três alças vasculares, conforme descrito previamente (FOLBERG; RUMMELT; PARYS-VAN GINDERDEUREN; HWANG *et al.*, 1993). Como controle externo positivo da reação, foi utilizada placenta humana com a marcação endotelial dos vasos das vilosidades placentárias (figura 3).

Figura 3 - Placenta utilizada como controle positivo para o anticorpo anti-CD34 (Imunohistoquímica, magnificação: 400x)



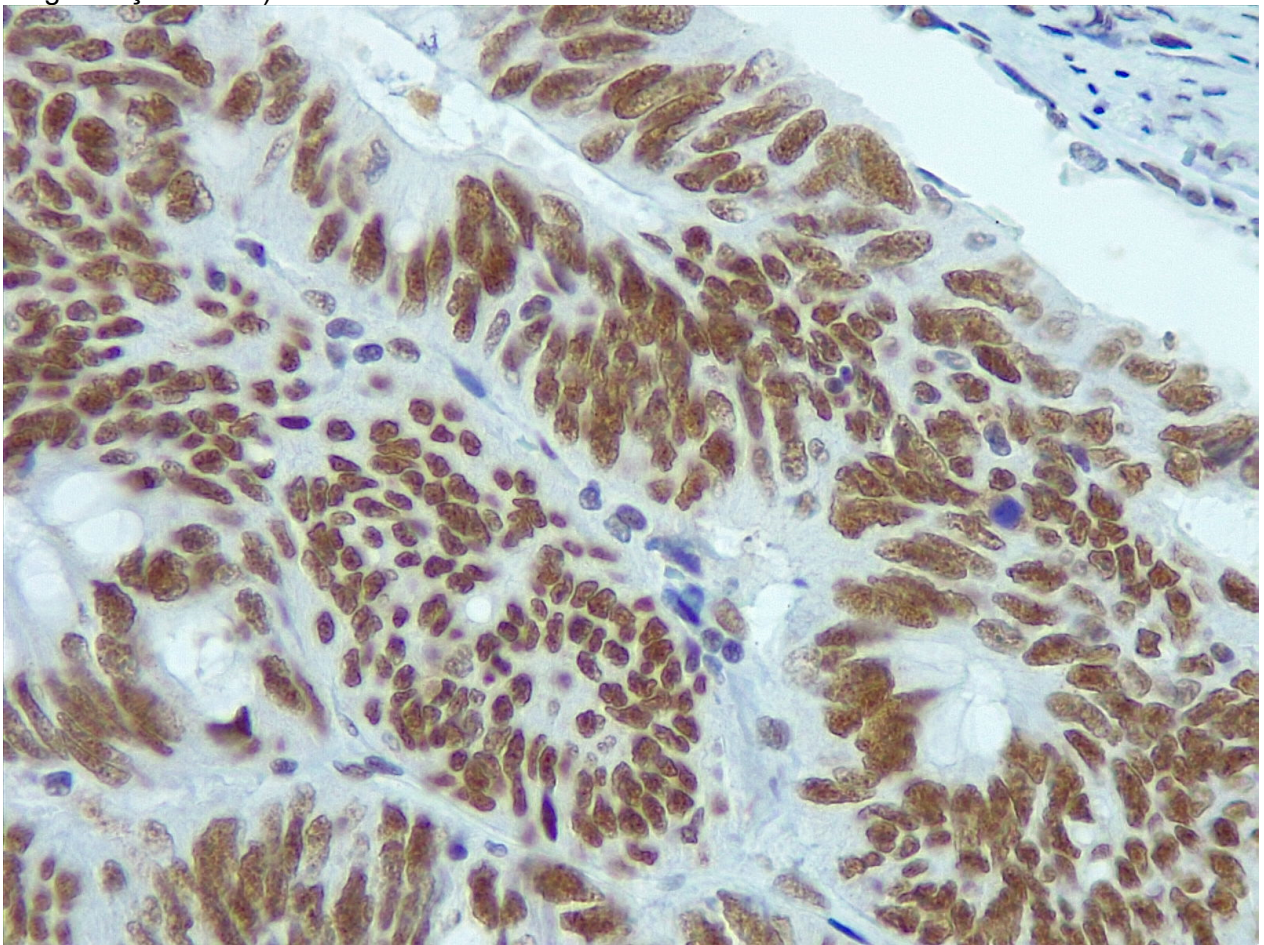
Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

5.3.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BAP1

Foram preparados cortes de parafina de 4 μ m, em seguida, as amostras foram incubadas em anticorpo monoclonal BAP1 (diluição 1:50; EPR226826-65 ab255611; Abcam). A reação de imuno-histoquímica foi realizada por meio do protocolo do kit Envision/HRP, DAB substrate, substrate buffer, Target Retrieval Solution, Low pH (50x Citrate buffer, pH 6) (Dako Omnis, Denmark). Para facilitar a avaliação da imunorreação de tumores fortemente pigmentados, foi feita uma contra-coloração com Giemsa, a fim

de distinguir a melanina da marcação com diaminobezidina (DAB). A imunorreatividade foi avaliada de forma semiquantitativa, semelhante ao descrito por (SZALAI; JIANG; VAN POPPELEN; JAGER *et al.*, 2018). Para isso, as lâminas foram avaliadas por inteiro, e a imunorreatividade foi avaliada nos núcleos e citoplasma utilizando um sistema de escore de quatro pontos (0 = positividade menor que 10%, 1 = positividade entre 10 e 33%, 2 = positividade entre 34% e 66%, 3 = positividade acima de 66%). O controle positivo externo utilizado foi cólon (figura 4).

Figura 4 - Cólon utilizado com controle positivo para o anticorpo anti-BAP1 (Imuno-histoquímica, magnificação: 400X)



Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

5.4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

As análises estatísticas deste estudo foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego California USA). A associação

entre os aspectos morfológicos, a expressão da IDO1 e a presença de metástases foi analisada usando o teste exato de Fisher.

6. RESULTADOS

A distribuição dos melanomas uveais de acordo com o sexo foi de 54% para mulheres e 46% para homens (figura 5). As neoplasias avaliadas foram em sua totalidade de pacientes brancos.

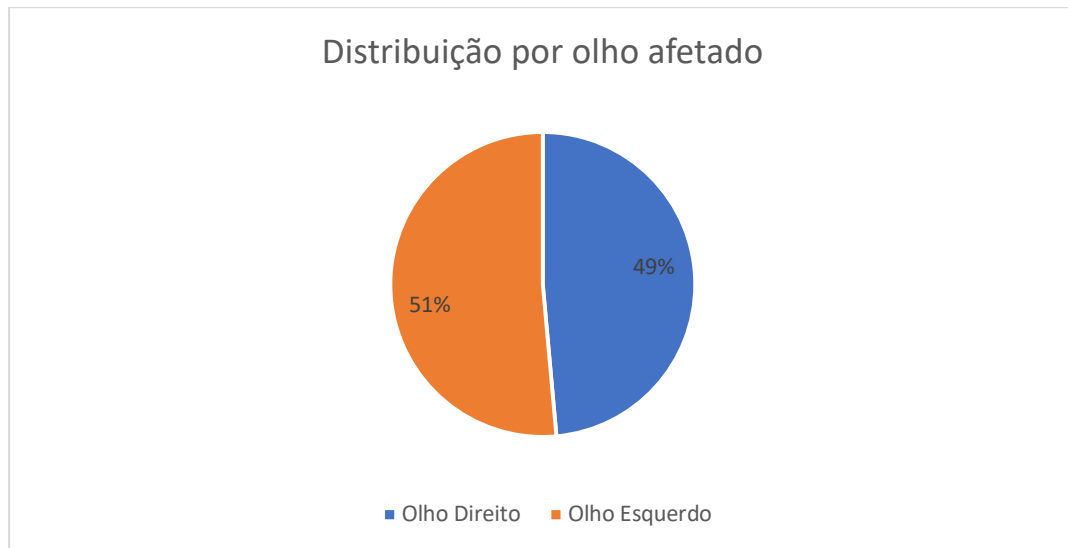
Figura 5 - Distribuição da neoplasia de acordo com o sexo



Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

A distribuição dos melanomas uveais, segundo olho afetado, foi de 51% afetando olho esquerdo e 49% afetando o olho direito (figura 6). Nenhum paciente teve os dois olhos afetados.

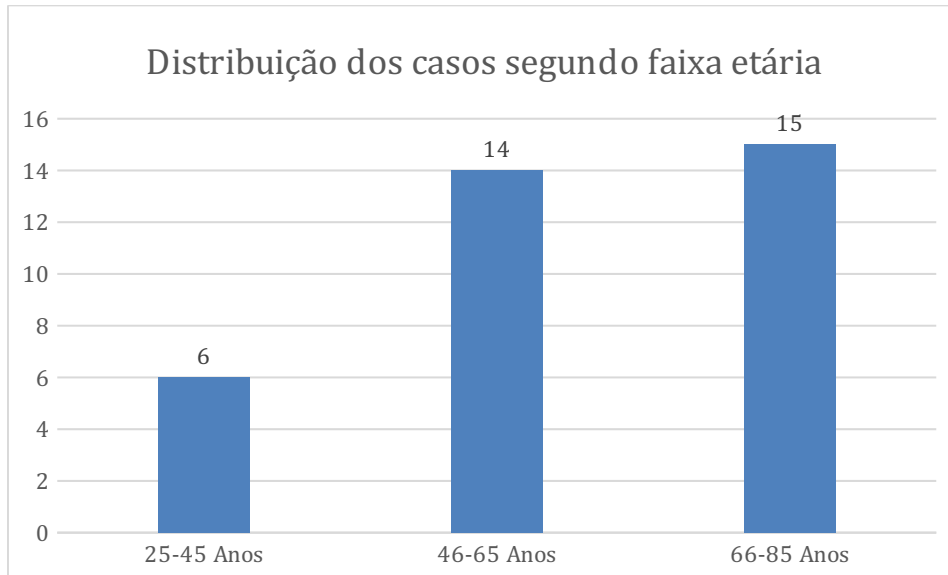
Figura 6 - Distribuição da neoplasia por olho afetado



Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

A distribuição dos melanomas uveais de acordo com a faixa etária no momento do diagnóstico foi de 17% de casos entre 25-45 anos, 40% entre 46-65 anos e 43% entre 66-85 anos (figura 7). O paciente mais novo tinha 29 anos ao diagnóstico e o paciente mais velho tinha 83 anos de idade. A idade média observada nas amostras desse estudo foi de 61,1 anos ($\pm 14,3$ anos).

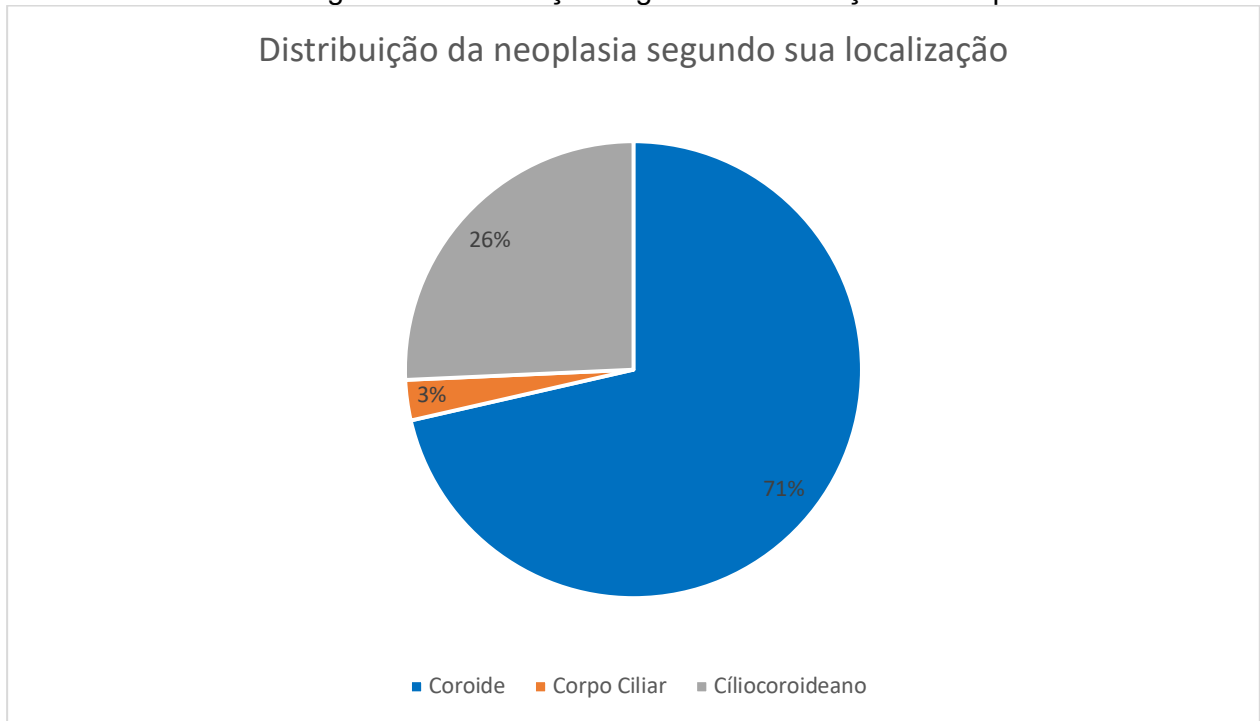
Figura 7 – Distribuição dos casos segunda faixa etária



Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

A distribuição dos melanomas uveais de acordo com a localização da neoplasia demonstrou que a maior frequência foi observada na coroide (71%) e a menor frequência em corpo ciliar (3%). Em 26%, a neoplasia acometeu coroide e corpo ciliar. (figura 8). Não foram observados casos de melanomas uveais em íris.

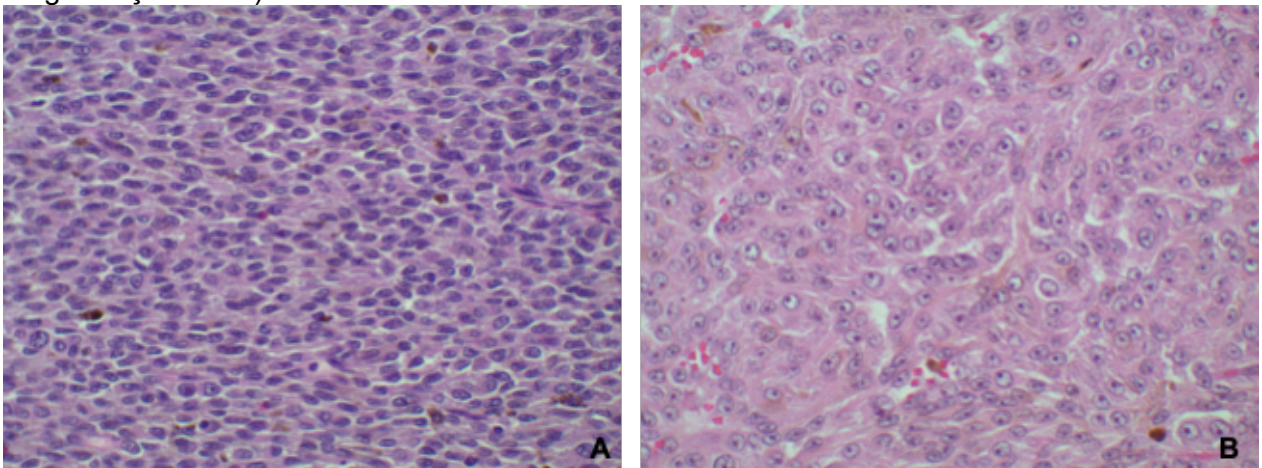
Figura 8 – Distribuição segundo a localização da neoplasia



Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

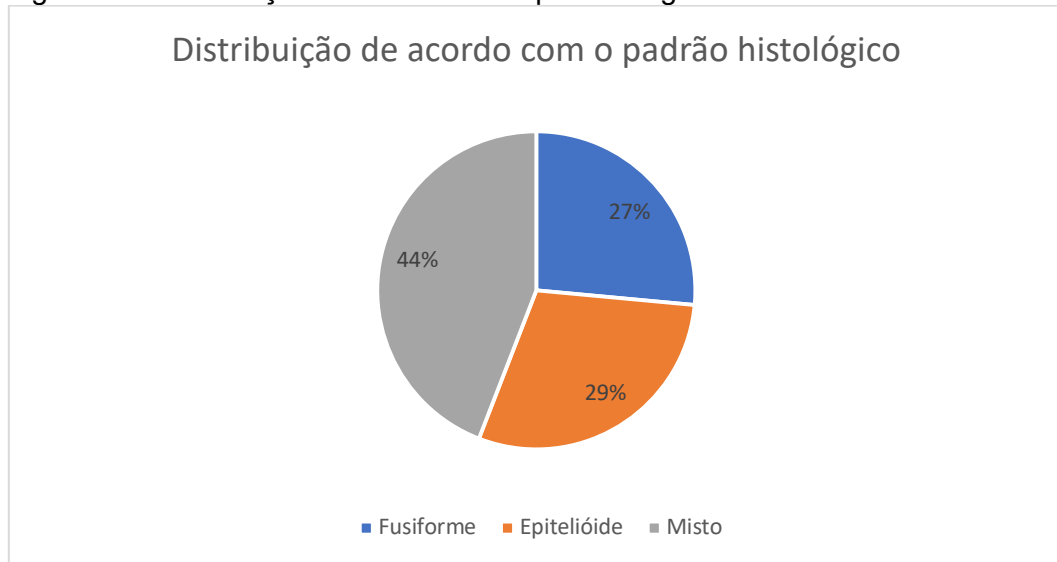
A distribuição dos melanomas uveais, segundo o padrão celular mostrou que há predomínio do tipo celular misto (44%) (figura 10). O tipo histológico epitelióide foi observado em 29% dos casos e o tipo fusiforme foi observado em 27% das amostras avaliadas.

Figura 9 - Diferentes tipos histológicos do melanoma uveal. Fusiforme (A), Epitelióide (B) (H&E, magnificação 400X)



Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

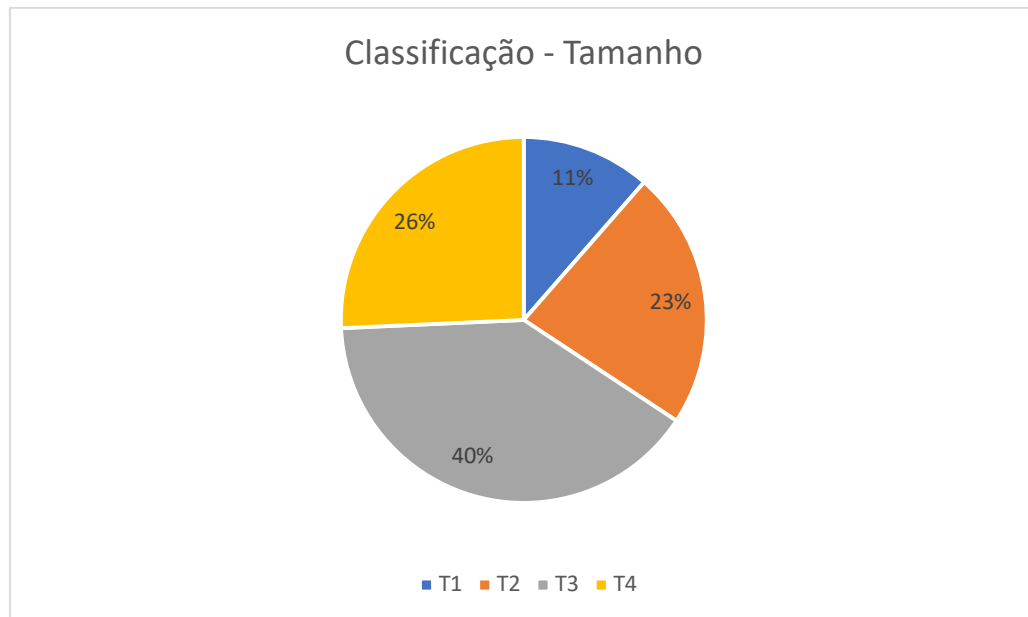
Figura 10 - Distribuição de acordo com tipo histológico



Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

Quanto ao tamanho das lesões, a distribuição dos melanomas uveais de acordo com a classificação da AJCC foi de 11% como T1, 23% na T2, 40% na T3 e 26% na T4 (figura 11). O diâmetro basal máximo médio das neoplasias foi de $14,5 \text{ mm} \pm 5,4 \text{ mm}$, tendo o menor valor igual a 5,0 mm e maior igual a 30,0 mm. A espessura média dos tumores foi de $9,7 \text{ mm} \pm 4,9 \text{ mm}$, tendo o menor igual a 2,4 mm e o maior de 25,0 mm (figura 12).

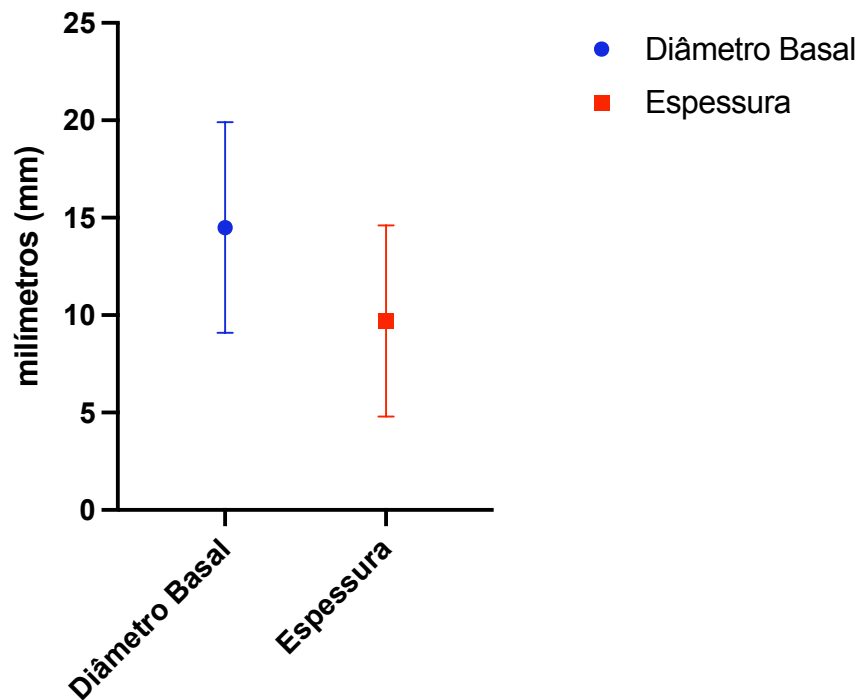
Figura 11 - Classificação por Tamanho (AJCC, 2017)



Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

Figura 12 - Dimensões médias das neoplasias

Dimensões dos melanomas uveais

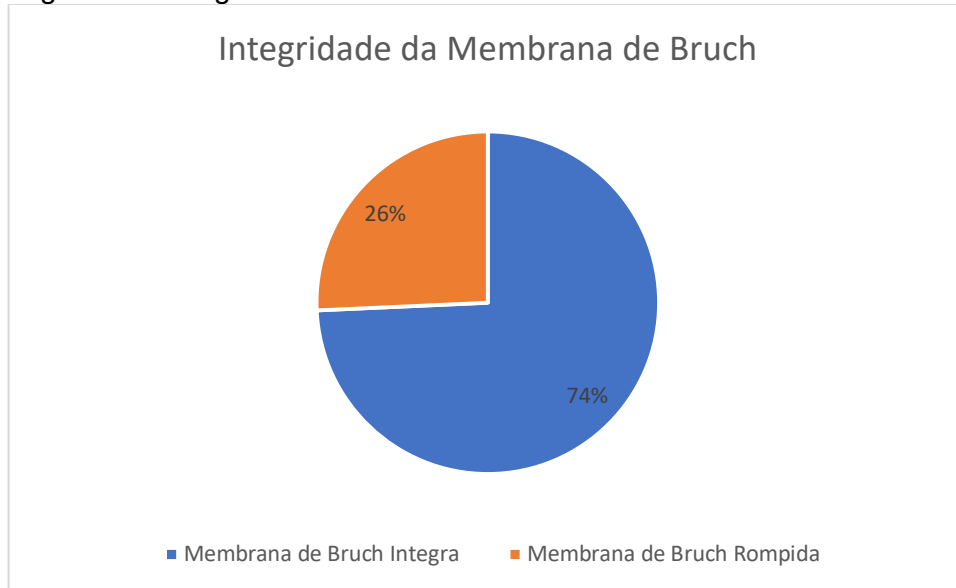


Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

A membrana de Bruch mostrou-se íntegra em 74% dos casos, enquanto nos cinco casos restantes 26% a mesma estava rompida (figura 13). Dos 35 casos

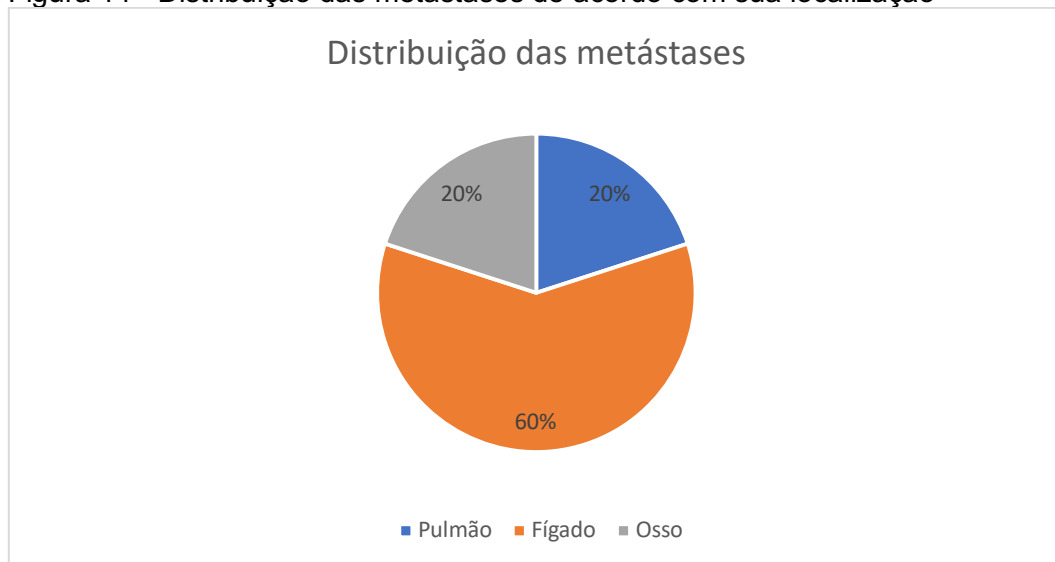
observados, foram constatadas metástases em 5 dos pacientes avaliados até o início de abril de 2022 (figura 14).

Figura 13 - Integridade da membrana de Bruch



Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

Figura 14 - Distribuição das metástases de acordo com sua localização

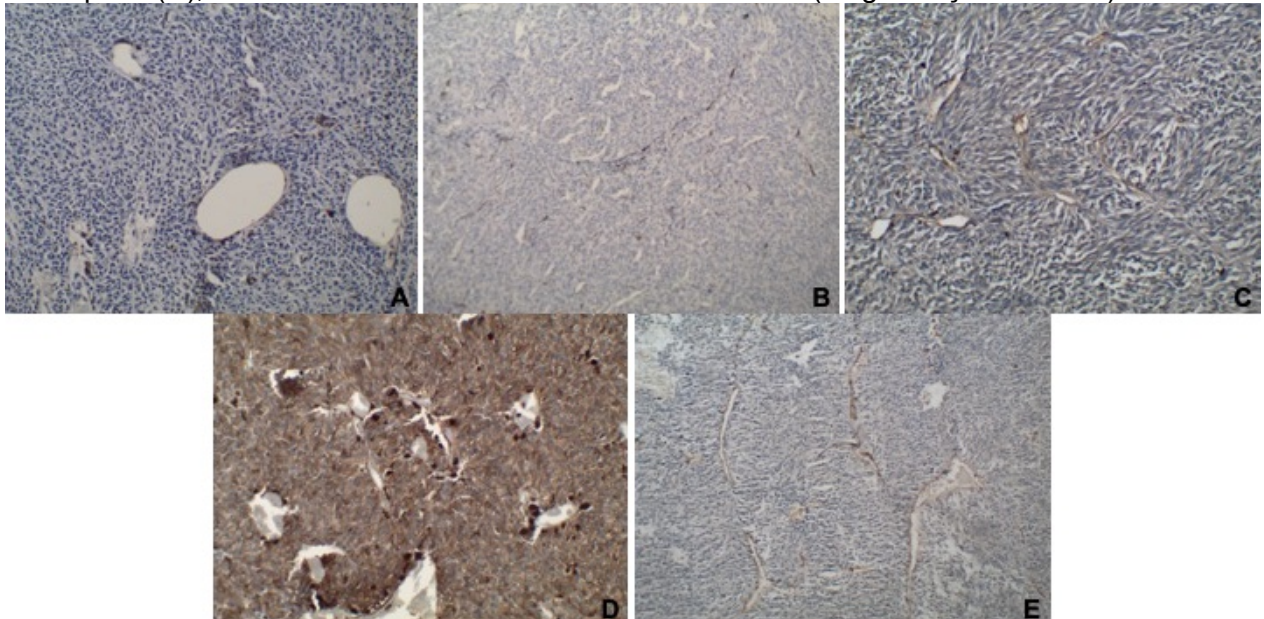


Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

A avaliação da trama microvascular nos melanomas uveais foi realizada por meio da marcação de imuno-histoquímica do epítipo CD34 (figura 15). Dos 35 casos avaliados, foi observada a formação de arcos, ou alças, vasculares em 6 casos (17%),

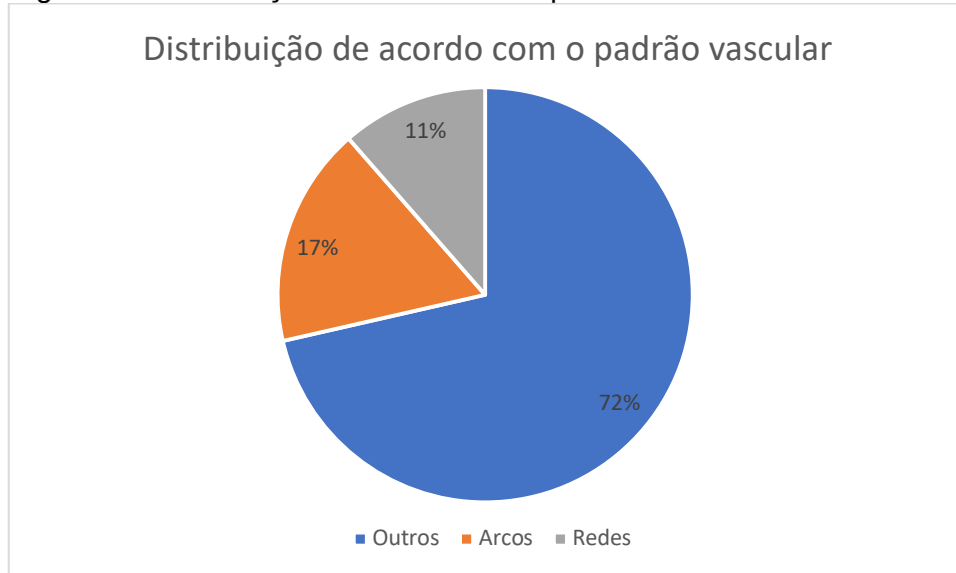
enquanto a presença de redes vasculares foi identificada em 4 casos (11%), conforme ilustra a figura 16. Já a microdensidade vascular variou amplamente entre os casos avaliados. A microdensidade vascular média dos casos avaliados foi de 31,3 vasos/0,313mm² (\pm 15 vasos), a contagem variou de 5,7 a 57,3 vasos/mm² do menor para maior valor.

Figura 15 - Padrões de trama vascular do melanoma uveal. Normal (A), Silencioso (B), Arco incompleto (C), Arco com entroncamento e redes vasculares. (Magnificação de 200x)



Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

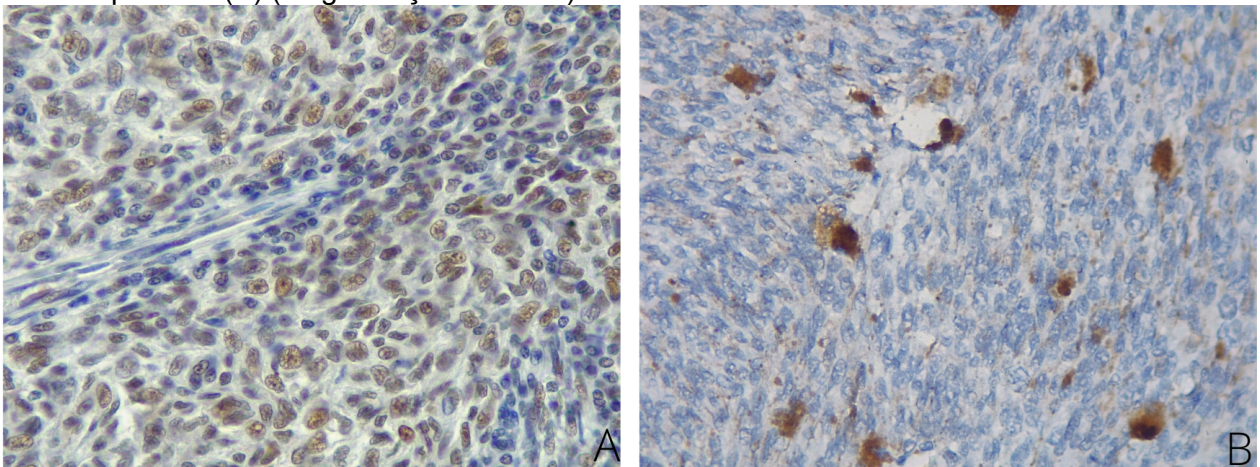
Figura 16 - Distribuição de acordo com o padrão vascular



Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

A expressão da proteína BAP1 foi avaliada em 35 olhos afetados por melanoma uveal. A expressão dessa proteína foi considerada baixa (escore 0-1) em 14 dos casos avaliados, e alta (escore 2-3) em 21 pacientes. As figuras 17 (A e B) mostram a classificação utilizada no presente estudo, baseado na metodologia descrita anteriormente, como baixa e alta expressão dessa proteína.

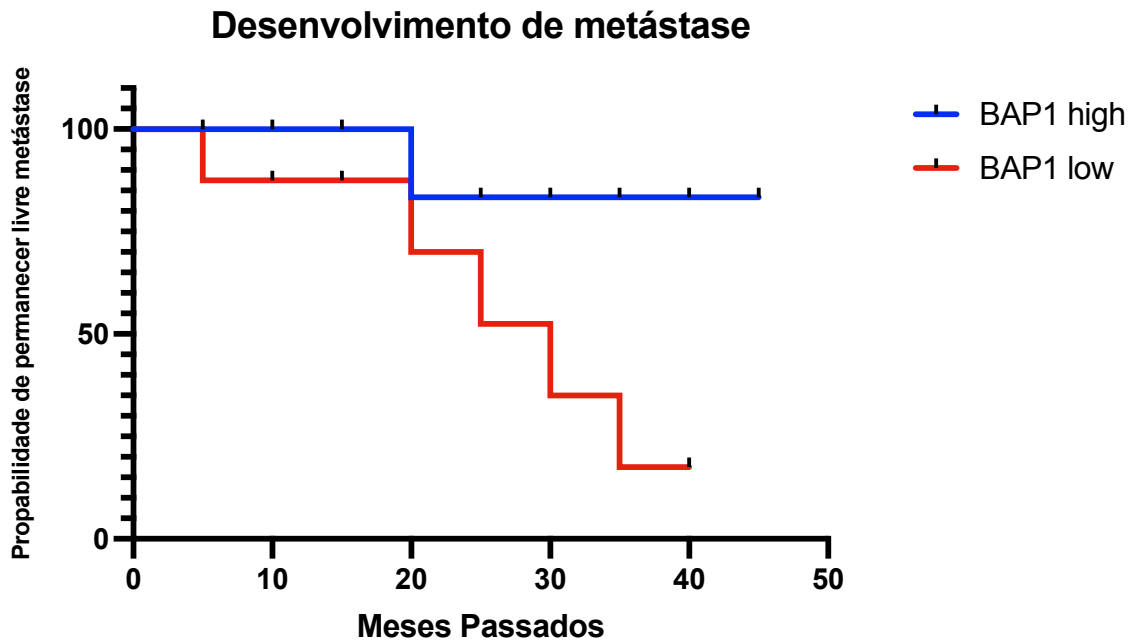
Figura 17 - Padrões de expressão da proteína BAP1 no melanoma uveal. Alta expressão (A) e baixa expressão (B) (Magnificação de 400x)



Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

A alta (*high*) expressão da proteína BAP1 está associada a uma menor chance de desenvolvimento precoce de metástase, enquanto a baixa (*low*) expressão está associada a metástase precoce (até 30 meses após o diagnóstico) ($p=0,0494$), conforme mostra a figura 18.

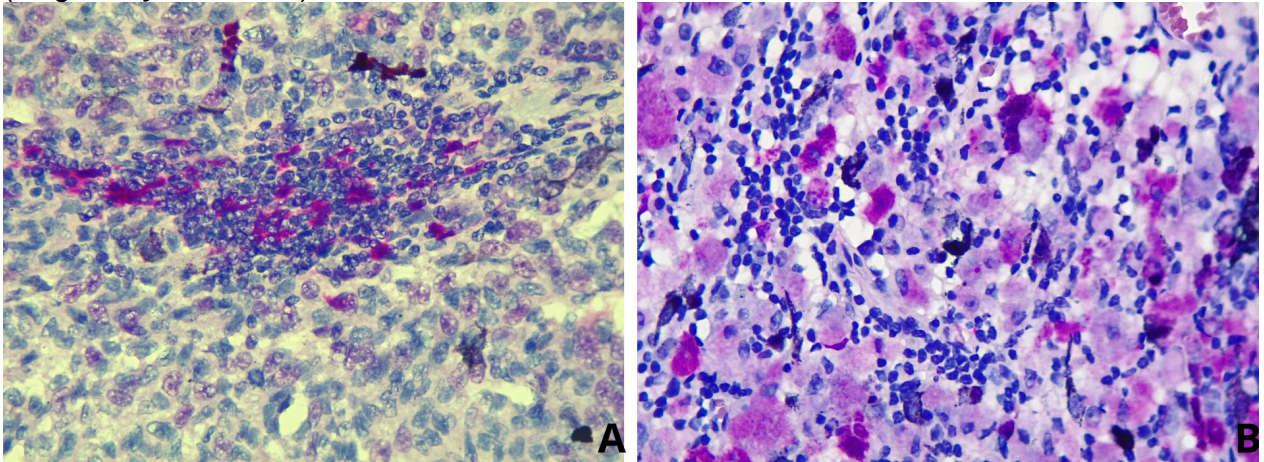
Figura 18 - Curva de evento de Kaplan-Meier para metástase de melanoma uveal nos grupos BAP1 *high* e BAP1 *low*.



Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

A expressão da proteína IDO1 também foi avaliada em 35 olhos afetados por melanoma uveal. A expressão da proteína IDO1 foi observada em células tumorais em apenas uma das amostras, de intensidade fraca e focal. No entanto, a expressão foi constatada em células do microambiente tumoral como histiócitos. A expressão dessa proteína foi considerada baixa (abaixo de 45,7 células/0,6mm²) em 18 dos casos avaliados, e alta (acima de 45,7 células/0,6mm²) em 17 pacientes. A figura 19 (A e B) mostra a classificação utilizada no presente estudo, baseado na metodologia descrita anteriormente, como alta e baixa expressão dessa proteína.

Figura 19 - Expressão da proteína IDO1 no microambiente tumoral de melanomas uveais.
(Magnificação de 200x)



Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

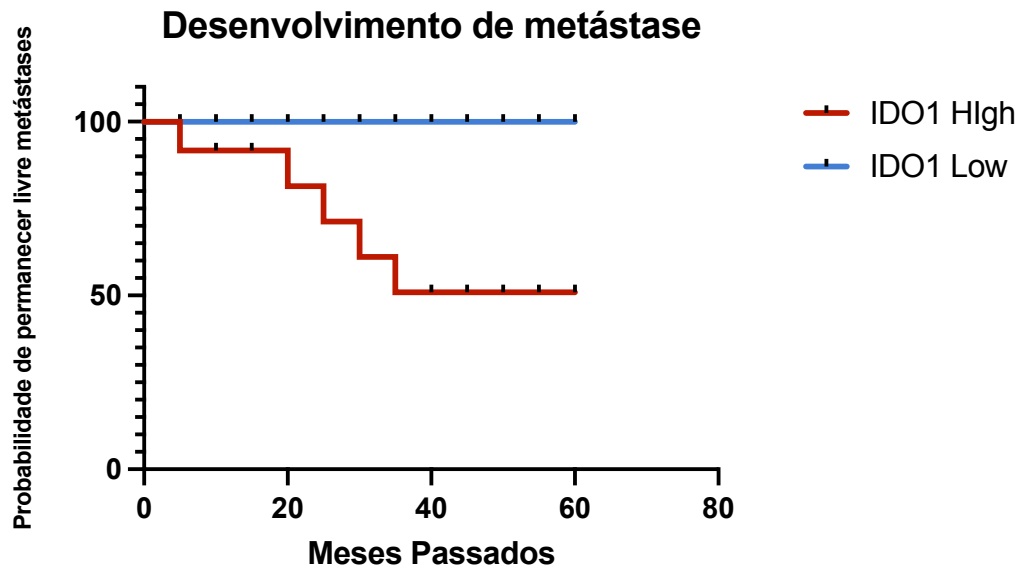
A tabela 2 mostra a comparação de alguns dados clínico-patológicos entre os grupos de alta e baixa expressão de IDO1. Uma associação significativa entre alta densidade de IDO1 no microambiente tumoral e possibilidade de desenvolvimento de metástase foi observada (figura 20).

Tabela 2 - Comparação de características clínico-patológicas entre baixa e alta densidade celular de IDO1

	Melanoma Uveal com baixa densidade de IDO1	Melanoma Uveal com alta densidade de IDO1	Valor p
Idade	57,2±13,7 anos	65,3±14 anos	0,0947
Sexo	7(M) 11(F)	9(M) 8(F)	
Diâmetro basal máximo	13,9±5,2 mm	15,1±5,7 mm	0,7652
Espessura	8,2±4,0 mm	11,0±5,3 mm	0,1478
Tipo celular	Fusifforme	39%	12%
	Misto	33%	59%
	Epitelióide	28%	29%
Classificação Tamanho	T1	6%	18%
	T2	22%	24%
	T3	39%	40%
	T4	33%	18%
Microdensidade vascular	31,9±14,1 vasos/0,313mm ²	30,7±16,2 vasos/0,313mm ²	0,8739
Ruptura da Membrana de Bruch	6/18 (33,3%)	3/17 (17,7%)	0,4430
Densidade de IDO1	22,2±15,5 céls/mm ²	85,4±34 céls/mm ²	<0,0001
Metástase	0/18	5/17	0,0299

Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

Figura 20 - Curva de evento de Kaplan-Meier para metástase de melanoma uveal nos grupos IDO1 high e IDO1 low.



Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

7. DISCUSSÃO

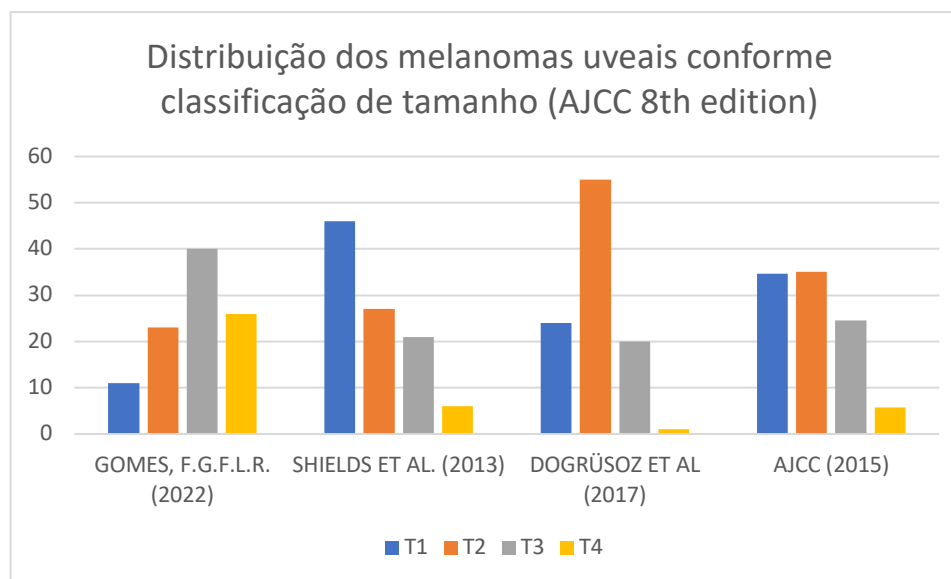
O presente estudo observou que a distribuição dos melanomas uveais de acordo com o sexo foi de 54% para mulheres e 46% para homens. Outros trabalhos encontraram resultados semelhantes (ARONOW; TOPHAM; SINGH, 2018; LUCENA; GOLDEMBERG; THULER; DE MELO, 2020; LUO; ZHANG; YANG; XIU *et al.*, 2022; XU; LOU; WANG; MIAO *et al.*, 2020), enquanto outros autores (MCLAUGHLIN; WU; JEMAL; MARTIN *et al.*, 2005) observaram que a incidência dessa neoplasia é 30% maior em homens que em mulheres.

A distribuição dos melanomas uveais, segundo a lateralidade, foi de 51% afetando olho esquerdo e 49% afetando o olho direito. A literatura corrobora com os dados obtidos no presente estudo (ARONOW; TOPHAM; SINGH, 2018; LUO; ZHANG; YANG; XIU *et al.*, 2022; MAHENDRARAJ; LAU; LEE; CHAMBERLAIN, 2016). Nenhum desses trabalhos observou diferença significativa em relação à lateralidade da lesão. O presente estudo não detectou nenhum caso de melanomas uveais múltiplos ou bilaterais, como citado por alguns pesquisadores (BHOURI; LUMBROSO; LEVY; DENDALE *et al.*, 2003; KHEIR; KIM; MATERIN, 2020; KOWAL; STRZAŁKA; MARKIEWICZ; ROMANOWSKA-DIXON *et al.*, 2015).

A American Joint Committee on Cancer (AJCC) classifica os melanomas uveais de acordo com suas dimensões (maior diâmetro de base e espessura). No presente estudo, a distribuição dos melanomas uveais de acordo com esta classificação foi de 11% na classificação T1, 23% na T2, 40% na T3 e 26% na T4. Em comparação aos dados observados na literatura (DOGRUSÖZ; BAGGER; VAN DUINEN; KROES *et al.*, 2017; FORCE, 2015; SHIELDS; KALIKI; FURUTA; FULCO *et al.*, 2013), no presente estudo foi observado que neoplasias na categoria T1 foram menos frequentes que em outros trabalhos (figura 21). Por outro lado, melanomas na categoria T2 foram mais frequentes no presente estudo quando comparado aos outros trabalhos. Essa diferença do presente estudo, em relação aos outros trabalhos, pode ocorrer devido ao diagnóstico mais tardio da neoplasia e também pelo fato de que as neoplasias menores não serem tratadas, pelo menos inicialmente, com enucleação, mas com placas de

braquiterapia. Em relação as dimensões das lesões, tanto o diâmetro basal máximo quanto a espessura média não diferiram dos trabalhos citados anteriormente.

Figura 21 - Comparação da distribuição dos casos de melanoma uveal conforme a classificação da AJCC (em %)



Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

A frequência em que a membrana de Bruch mostrou-se rompida 23% dos casos, esse dado é corroborado por alguns estudos (HAINSWORTH; SOMMERVILLE; RANSON; TODD *et al.*, 2006; KALIKI; SHIELDS, 2017; MASHAYEKHI; TUNCER; SHIELDS; SHIELDS, 2010). Dos 35 casos observados, cinco pacientes (14,3%) desenvolveram a doença metastática, sendo 3 casos no fígado (60%), dois no pulmão (20%) e um em vértebra (20%). A literatura relata que a ocorrência doença metastática é bastante variável e pode ocorrer em até 50% dos pacientes (The COMS randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma: V. Twelve-year mortality rates and prognostic factors: COMS report No. 28, 2006; BAILY; O'NEILL; DUNNE; CUNNINGHAM *et al.*, 2019; BHATIA; MOON; MARGOLIN; WEBER *et al.*, 2012; BRANISTEANU; BOGDANICI; BRANISTEANU; MARANDUCA *et al.*, 2021; EINHORN; BURGESS; GOTTLIEB, 1974; KUJALA; MÄKITIE; KIVELÄ, 2003; LANE; KIM; GRAGOUDAS, 2015; ONKEN; WORLEY; CHAR; AUGSBURGER *et al.*, 2012; ONKEN; WORLEY; TUSCAN; HARBOUR, 2010), corroborando os dados avaliados no presente

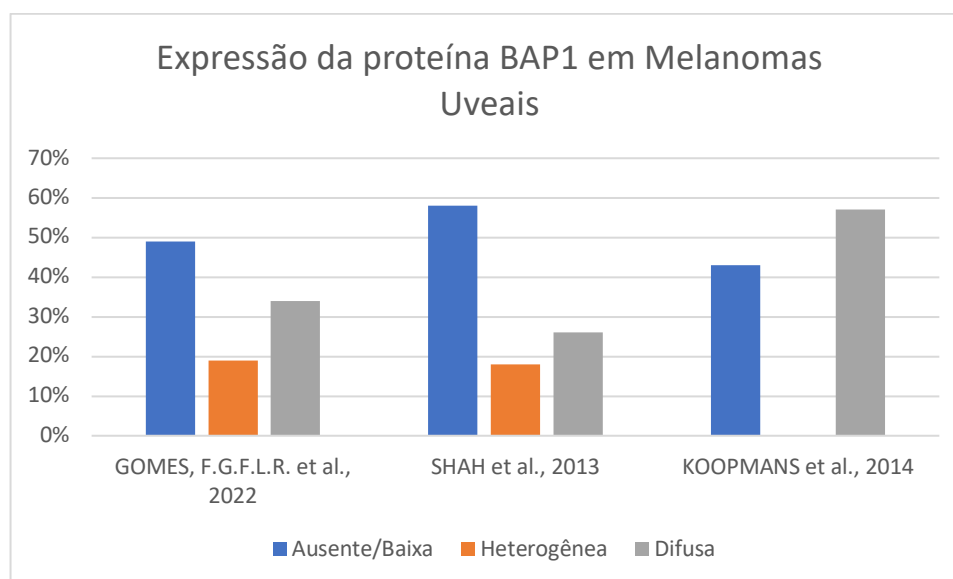
estudo. A distribuição das metástases por localização também seguiu o padrão observado na literatura, sendo o fígado o órgão mais afetado, seguido pelos pulmões e ossos, respectivamente. As diferenças numéricas relativas observadas entre esse estudo e a literatura pode estar relacionada ao número de casos reduzidos e baixa atividade biológica, como observado em outros trabalhos (LUCENA; GOLDEMBERG; THULER; DE MELO, 2020; MCLEAN; FOSTER; ZIMMERMAN, 1982; SHIELDS; FURUTA; THANGAPPAN; NAGORI *et al.*, 2009)

A população avaliada no presente estudo teve a trama microvascular nos melanomas uveais foi realizada por meio da marcação de imuno-histoquímica do epítipo CD34. A microdensidade vascular observada foi semelhante a observada em outros trabalhos (FOSS; ALEXANDER; JEFFERIES; HUNGERFORD *et al.*, 1996; MÄKITIE; SUMMANEN; TARKKANEN; KIVELÄ, 1999), entretanto, a correlação com prognóstico pior não foi observada ($p=0698$), conforme os trabalhos citados anteriormente. Em relação aos padrões morfológicos da vasculatura, o presente estudo não apresentou correlação com prognóstico pior (FOLBERG; CHEN; BOLDT; PE'ER *et al.*, 2001; FOLBERG; RUMMELT; PARYS-VAN GINDERDEUREN; HWANG *et al.*, 1993; KIVELÄ; MÄKITIE; AL-JAMAL; TOIVONEN, 2004; MÄKITIE; SUMMANEN; TARKKANEN; KIVELÄ, 1999). Esses resultados podem estar limitados pelo pequeno tamanho amostral, outros estudos que avaliaram essa correlação eram multicêntricos, contando com um número de amostras consideravelmente maior.

A expressão da proteína BAP1 foi avaliada por meio da técnica de imunohistoquímica em material parafinado. A expressão de BAP1 foi considerada baixa em 60% dos pacientes que desenvolveram metástases, esse dado é semelhante ao observado por Szalai e colaboradores (SZALAI; JIANG; VAN POPPELEN; JAGER *et al.*, 2018). Outro estudo (SHAH; DAVID BOURNE; MURALI, 2013) observou que 58% dos melanomas avaliados não expressaram a proteína BAP1, enquanto 18% expressou de forma heterogênea e 26% apresentou expressão difusa dessa proteína. O presente estudo detectou distribuição semelhante ao trabalho citado anteriormente, conforme a figura 22. O presente estudo demonstrou que a baixa expressão, ou ausência, da proteína BAP1 em melanomas uveais está relacionada ao risco de desenvolvimento de metástase, conforme observado em outros trabalhos (KOOPMANS; VERDIJK;

BROUWER; VAN DEN BOSCH *et al.*, 2014; SHAH; DAVID BOURNE; MURALI, 2013; SZALAI; JIANG; VAN POPPELEN; JAGER *et al.*, 2018). A avaliação da proteína BAP1 por meio da imunohistoquímica pode ser utilizada de forma rápida e com bom custo-benefício na identificação de pacientes com melanomas agressivos.

Figura 22 - Distribuição dos Melanomas Uveais conforme expressão da proteína BAP1



Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

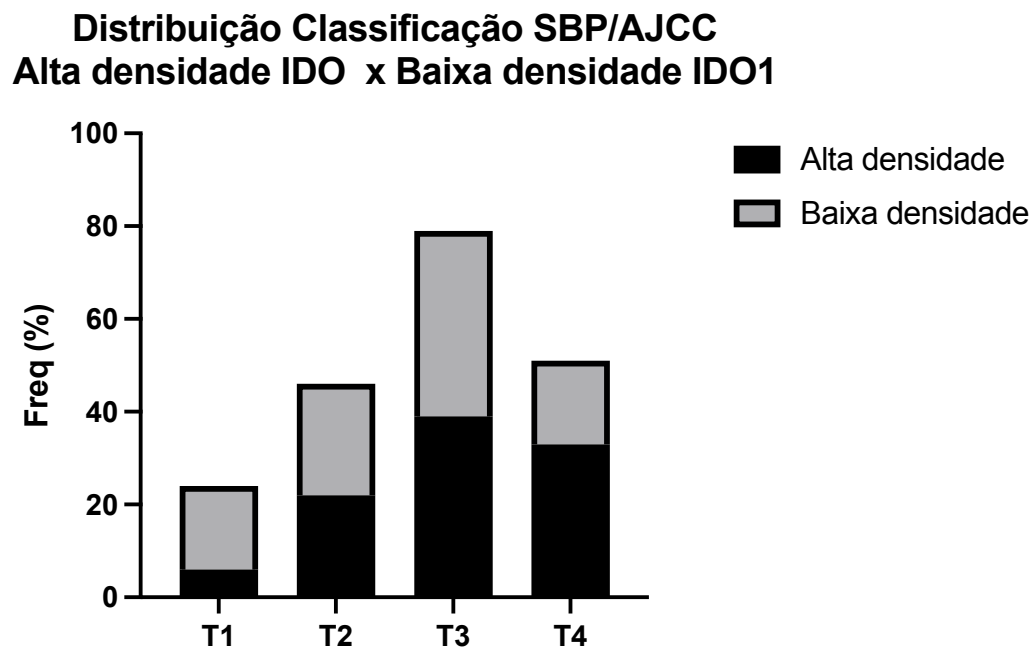
A expressão da enzima IDO1 é um dos vários *checkpoints* de evasão do sistema imunológico utilizado por células tumorais (MUNN; MELLOR, 2013). Alguns testes clínicos investigaram, ou estão investigando, os efeitos de inibidores de IDO1 (epacadostat, doximob, entre outros) (BEATTY; O'DWYER; CLARK; SHI *et al.*, 2017; BROCHEZ; CHEVOLET; KRUSE, 2017; SOLIMAN; MINTON; HAN; ISMAIL-KHAN *et al.*, 2016). Os estudos sobre a avaliação da expressão de IDO1 em melanomas uveais são escassos (CHEN; MELLON; MAYHEW; WANG *et al.*, 2007; LIANG; PENG; ZENG; ZHAO *et al.*, 2019; STÅLHAMMAR; SEREGARD; GROSSNIKLAUS, 2019; TERAJ; LONDIN; ROCHANI; LINK *et al.*, 2020)

O presente estudo avaliou a expressão de IDO1 em amostras de pacientes acometidos por melanoma uveal primário. Foi observada a expressão de IDO1 em células do microambiente tumoral. Entretanto, a expressão de IDO1 nas células neoplásicas foi muito baixa. Estudos prévios também observaram que o melanoma

uveal primário não expressa IDO1 *in situ*, mas pode expressá-la em células do seu microambiente tumoral (CHEN; MELLON; MAYHEW; WANG *et al.*, 2007; LIANG; PENG; ZENG; ZHAO *et al.*, 2019). Stålhammar e colaboradores (STÅLHAMMAR; SEREGARD; GROSSNIKLAUS, 2019) não apenas observaram a expressão de IDO1 em células do microambiente tumoral, mas também em células neoplásicas. Pesquisas realizadas em outros tipos de neoplasia demonstraram expressão de IDO1 em células do microambiente tumoral, como macrófagos, células dendríticas e vasos sanguíneos (CHOE; YUN; JEON; KIM *et al.*, 2014). Uma das hipóteses abordadas sobre o desenvolvimento de metástases está relacionada a expressão precoce de IDO1, como *checkpoint* imunológico.

Além da avaliação da expressão de IDO1 em amostras de melanoma uveal, também foi feita uma correlação de sua expressão com algumas características clinicopatológicas. O grupo de alta densidade de IDO1 não apresentou diferenças de tamanho tumoral em relação ao grupo de baixa densidade, nem na classificação SBP/AJCC (figura 23) nem em diâmetro basal máximo nem em espessura. Outros autores sugerem que a alta expressão de IDO1 tem correlação com tumores de tamanhos menores (LIANG; PENG; ZENG; ZHAO *et al.*, 2019). Entretanto, os autores citados anteriormente observaram uma relação entre a ruptura da membrana de Bruch (melanomas com formato de cogumelo) e alta expressão de IDO1, os dados obtidos no presente trabalho não corroboram essa informação ($p=0,5805$). Stålhammar e coautores (STÅLHAMMAR; SEREGARD; GROSSNIKLAUS, 2019) demonstraram a correlação entre tamanho e formato do melanoma uveal e densidade de células que expressão IDO1. Mais estudos serão necessários para averiguar essa correlação.

Figura 23 - Comparação da distribuição entre alta e baixa densidade de células positivas para o marcador IDO e tamanho tumoral (AJCC)



Fonte: Gomes, F.G.F.L.R., 2022

A microdensidade vascular também não apresentou diferenças significativas entre os grupos com alta ou baixa densidade de células positivas para IDO1. Algumas publicações demonstraram uma relação positiva entre expressão de IDO1 e angiogênese ou com regulação positiva de proteínas que, no microambiente tumoral, possam promover tal efeito (LI; TREDGET; GHAFARI; LIN *et al.*, 2006; WEI; ZHU; LI; LI *et al.*, 2018). Foi demonstrado por meio de pesquisas com câncer de mama que a expressão de IDO1 e CD105, no entanto a mesma correlação não foi observada quando feita a comparação utilizando o marcador endotelial CD31 (WEI; ZHU; LI; LI *et al.*, 2018). Soliman (SOLIMAN; RAWAL; FULP; LEE *et al.*, 2013) observou o comportamento inverso do estudo citado anteriormente, demonstrando que níveis mais baixos de expressão de IDO1 estão relacionados a maior angiogênese. Mais estudos são necessários para se estabelecer uma relação entre IDO1 e a microdensidade vascular em melanomas uveais, utilizando mais marcadores e estudos complementares em linhagens celulares e modelos animais, com o objetivo de melhor caracterizar o mecanismo associado à angiogênese nestes tumores.

A densidade de células positivas para IDO não apresentou correlação com a ruptura da membrana de Bruch. Apesar da ruptura da membrana de Bruch não ser considerada um fator prognóstico por vários autores (SEDDON; ALBERT; LAVIN; ROBINSON, 1983; SHAMMAS; BLODI, 1977; SZALAI; JIANG; VAN POPPELEN; JAGER *et al.*, 2018), a pesquisa conduzida pelo grupo de Liang (LIANG; PENG; ZENG; ZHAO *et al.*, 2019) observou uma correlação entre alta expressão de IDO1 e tumores com formato de cogumelo, característico da ruptura desta membrana. Além disso, Liang e colaboradores observaram uma diferença na positividade para IDO1, por meio de estudo imuno-histoquímico, entre as células tumorais que ultrapassaram a membrana de Bruch e as que estavam localizadas abaixo desta membrana, sugerindo que existam diferenças no microambiente tumoral entre essas duas regiões. Essa observação é inconsistente com a afirmação de que o melanoma uveal e seu microambiente tumoral não precisam da expressão de IDO1 para manter o ambiente imunoprivilegiado (CHEN; MELLON; MAYHEW; WANG *et al.*, 2007).

É digno de nota que a expressão de IDO1 está associada a prognóstico pior em diversas neoplasias. No entanto, também existem evidências na literatura corroborando a informação de que a expressão de IDO1 faz parte de um mecanismo de tolerância imunológica adquirida (PRENDERGAST, 2008), sugerindo que sua expressão aumentada também possa estar relacionada a fatores benéficos. No presente estudo, observamos uma associação entre a alta densidade de células expressando IDO1 com desenvolvimento de metástases em melanoma uveal. Liang e colaboradores (LIANG; PENG; ZENG; ZHAO *et al.*, 2019), avaliaram a expressão de IDO1 em melanomas uveais, e observaram correlação com a forma do tumor, como citado anteriormente. Entretanto, não foram observadas diferenças relacionadas ao surgimento de metástases entre os grupos de alta e baixa expressão de IDO1, nem nos grupos em que havia expressão de IDO1 com os que não foi observada a expressão dessa proteína. Enquanto isso, Stålhammar e coautores (STÅLHAMMAR; SEREGARD; GROSSNIKLAUS, 2019) observaram que a maior densidade celular de T cell Ig ITIM e IDO1 estão relacionados a um pior prognóstico em relação ao desenvolvimento de metástases. No presente estudo, ainda se faz necessária a caracterização detalhada da população celular presente nesse microambiente tumoral, com particular atenção aos

histiócitos. Em estudos realizados em outras neoplasias, autores descreveram a correlação entre alta expressão de IDO1 nas populações celulares do microambiente tumoral e o prognóstico pior (CHEVOLET; SPEECKAERT; HASPESLAGH; NEYNS *et al.*, 2014; CHOE; YUN; JEON; KIM *et al.*, 2014; LAIMER; TROESTER; KLOSS; SCHAFFER *et al.*, 2011; ZHAI; LADOMERSKY; LENZEN; NGUYEN *et al.*, 2018). As razões pelas quais pacientes com maior expressão de IDO1 apresentam menor período de sobrevida livre de complicações ainda é desconhecida, o que reflete o complexo papel dessa enzima nos diferentes tipos de cânceres e no microambiente tumoral.

Algumas das limitações do presente estudo estão relacionadas ao baixo número amostral, tornando os intervalos de confiança menores e ao tempo de acompanhamento (mais curto) dos pacientes com diagnóstico recente

8. CONCLUSÃO

A enzima IDO1 está relacionada a várias condições fisiológicas e uma variedade de processos fisiopatológicos, desde infecções, inflamação crônica, processos alérgicos, desordens autoimunes, dentre outros. A expressão de IDO1 no processo de desenvolvimento do melanoma uveal, bem como em outros tipos de neoplasias, pode ser considerada um evento significativo no seu processo de patogênese. A IDO1 é expressa em uma variedade de neoplasias e está, normalmente, associada a um prognóstico pior.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam uma correlação entre a alta densidade de células do microambiente tumoral positivas para IDO1 e o surgimento precoce de metástases. A confirmação deste achado em estudos com grande número de casos de melanoma uveal poderá indicar que, de fato, a expressão de IDO1 no microambiente tumoral possa ser mais um fator de influência no comportamento biológico da neoplasia, abrindo a possibilidade do uso de inibidores desta enzima com o objetivo de contribuir para a alteração do curso natural da doença.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, A. M.; CRAWFORD, M.; BERTERA, S.; RUDERT, W. A. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted NOD Islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes. **Diabetes**, 51, n. 2, p. 356-365, Feb 2002.
- ALGAZI, A. P.; TSAI, K. K.; SHOUSHARI, A. N.; MUNHOZ, R. R. *et al.* Clinical outcomes in metastatic uveal melanoma treated with PD-1 and PD-L1 antibodies. **Cancer**, 122, n. 21, p. 3344-3353, Nov 15 2016.
- ALL-ERICSSON, C.; GIRNITA, L.; MÜLLER-BRUNOTTE, A.; BRODIN, B. *et al.* c-Kit-dependent growth of uveal melanoma cells: a potential therapeutic target? **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 45, n. 7, p. 2075-2082, Jul 2004.
- AMBROSINI, G.; MUSI, E.; HO, A. L.; DE STANCHINA, E. *et al.* Inhibition of mutant GNAQ signaling in uveal melanoma induces AMPK-dependent autophagic cell death. **Mol Cancer Ther**, 12, n. 5, p. 768-776, May 2013.
- ANDTBACKA, R. H.; KAUFMAN, H. L.; COLLICHIO, F.; AMATRUDA, T. *et al.* Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. **J Clin Oncol**, 33, n. 25, p. 2780-2788, Sep 01 2015.
- ANGI, M.; KALIRAI, H.; TAKTAK, A.; HUSSAIN, R. *et al.* Prognostic biopsy of choroidal melanoma: an optimised surgical and laboratory approach. **British Journal of Ophthalmology**, 101, n. 8, p. 1143, 2017.
- ARONOW, M. E.; TOPHAM, A. K.; SINGH, A. D. Uveal Melanoma: 5-Year Update on Incidence, Treatment, and Survival (SEER 1973-2013). **Ocular Oncology and Pathology**, 4, n. 3, p. 145-151, 2018.
- AUGSBURGER, J. J.; CORRÊA, Z. M.; SHAIKH, A. H. Effectiveness of treatments for metastatic uveal melanoma. **Am J Ophthalmol**, 148, n. 1, p. 119-127, Jul 2009.
- BABAN, B.; CHANDLER, P.; MCCOOL, D.; MARSHALL, B. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific. **J Reprod Immunol**, 61, n. 2, p. 67-77, Apr 2004.
- BADERCA, F.; SOLOVAN, C.; BOGHIAN, L. Epidemiological and morphological data of ocular melanocytic lesions. **Rom J Morphol Embryol**, 54, n. 1, p. 77-83, 2013.
- BADERCA, F.; VINCZE, D.; BALICA, N.; SOLOVAN, C. Mucosal melanomas in the elderly: challenging cases and review of the literature. **Clin Interv Aging**, 9, p. 929-937, 2014.

BAILY, C.; O'NEILL, V.; DUNNE, M.; CUNNINGHAM, M. *et al.* Uveal Melanoma in Ireland. **Ocular Oncology and Pathology**, 5, n. 3, p. 195-204, 2019.

BARNHILL, R. L.; BOLOGNIA, J. L. Neurotropic melanoma with prominent melanization. **Journal of Cutaneous Pathology**, 22, n. 5, p. 450-459, 1995.

BEATTY, G. L.; O'DWYER, P. J.; CLARK, J.; SHI, J. G. *et al.* First-in-Human Phase I Study of the Oral Inhibitor of Indoleamine 2,3-Dioxygenase-1 Epacadostat (INCB024360) in Patients with Advanced Solid Malignancies. **Clin Cancer Res**, 23, n. 13, p. 3269-3276, 07 01 2017.

BEUTELSPACHER, S. C.; PILLAI, R.; WATSON, M. P.; TAN, P. H. *et al.* Function of indoleamine 2,3-dioxygenase in corneal allograft rejection and prolongation of allograft survival by over-expression. **Eur J Immunol**, 36, n. 3, p. 690-700, Mar 2006.

BHATIA, S.; MOON, J.; MARGOLIN, K. A.; WEBER, J. S. *et al.* Phase II Trial of Sorafenib in Combination with Carboplatin and Paclitaxel in Patients with Metastatic Uveal Melanoma: SWOG S0512. **PLOS ONE**, 7, n. 11, p. e48787, 2012.

BHOURI, L.; LUMBROSO, L.; LEVY, C.; DENDALE, R. *et al.* [Bilateral uveal melanomas. Five case reports]. **J Fr Ophthalmol**, 26, n. 2, p. 149-153, Feb 2003.

BODAGHI, B.; GOUREAU, O.; ZIPETO, D.; LAURENT, L. *et al.* Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. **J Immunol**, 162, n. 2, p. 957-964, Jan 15 1999.

BORGHAEI, H.; PAZ-ARES, L.; HORN, L.; SPIGEL, D. R. *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med**, 373, n. 17, p. 1627-1639, Oct 22 2015.

BRAHMER, J.; RECKAMP, K. L.; BAAS, P.; CRINÒ, L. *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med**, 373, n. 2, p. 123-135, Jul 09 2015.

BRANISTEANU, D. C.; BOGDANICI, C. M.; BRANISTEANU, D. E.; MARANDUCA, M. A. *et al.* Uveal melanoma diagnosis and current treatment options (Review). **Exp Ther Med**, 22, n. 6, p. 1428, 2021/12/01 2021.

BROCHEZ, L.; CHEVOLET, I.; KRUSE, V. The rationale of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition for cancer therapy. **European Journal of Cancer**, 76, p. 167-182, 2017/05/01/ 2017.

BUDER, K.; GESIERICH, A.; GELBRICH, G.; GOEBELER, M. Systemic treatment of metastatic uveal melanoma: review of literature and future perspectives. **Cancer Med**, 2, n. 5, p. 674-686, Oct 2013.

CAMARGO, L. P.; CONCEIÇÃO, L. G.; COSTA, P. R. S. **Neoplasias melanocíticas cutâneas em cães: estudo retrospectivo de 68 casos (1996-2004)**. Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, v. 45, n. 2, p. 138-152, 2008. Braz. J. Vet. Res. Animal Sci., p.15. 2008.

CAMINAL, J. M.; MEJIA-CASTILLO, K. A.; ARIAS, L.; CATALA, J. *et al.* Subthreshold transpupillary thermotherapy in management of foveal subretinal fluid in small pigmented choroidal lesions. **Retina**, 33, n. 1, p. 194-199, Jan 2013.

CARVAJAL, R. D.; PIPERNO-NEUMANN, S.; KAPITEIJN, E.; CHAPMAN, P. B. *et al.* Selumetinib in Combination With Dacarbazine in Patients With Metastatic Uveal Melanoma: A Phase III, Multicenter, Randomized Trial (SUMIT). **J Clin Oncol**, 36, n. 12, p. 1232-1239, Apr 20 2018.

CARVAJAL, R. D.; SCHWARTZ, G. K.; MANN, H.; SMITH, I. *et al.* Study design and rationale for a randomised, placebo-controlled, double-blind study to assess the efficacy of selumetinib (AZD6244; ARRY-142886) in combination with dacarbazine in patients with metastatic uveal melanoma (SUMIT). **BMC Cancer**, 15, p. 467, Jun 10 2015.

CARVAJAL, R. D.; SCHWARTZ, G. K.; TEZEL, T.; MARR, B. *et al.* Metastatic disease from uveal melanoma: treatment options and future prospects. **Br J Ophthalmol**, 101, n. 1, p. 38-44, Jan 2017.

CARVAJAL, R. D.; SOSMAN, J. A.; QUEVEDO, J. F.; MILHEM, M. M. *et al.* Effect of selumetinib vs chemotherapy on progression-free survival in uveal melanoma: a randomized clinical trial. **JAMA**, 311, n. 23, p. 2397-2405, Jun 18 2014.

CASSOUX, N.; RODRIGUES, M. J.; PLANCHER, C.; ASSELAIN, B. *et al.* Genome-wide profiling is a clinically relevant and affordable prognostic test in posterior uveal melanoma. **Br J Ophthalmol**, 98, n. 6, p. 769-774, Jun 2014.

CHAR, D. H.; BOVE, R.; PHILLIPS, T. L. Laser and proton radiation to reduce uveal melanoma-associated exudative retinal detachments. **Am J Ophthalmol**, 136, n. 1, p. 180-182, Jul 2003.

CHAR, D. H.; MILLER, T. Accuracy of presumed uveal melanoma diagnosis before alternative therapy. **Br J Ophthalmol**, 79, n. 7, p. 692-696, Jul 1995.

CHEN, P. W.; MELLON, J. K.; MAYHEW, E.; WANG, S. *et al.* Uveal melanoma expression of indoleamine 2,3-deoxygenase: Establishment of an immune privileged environment by tryptophan depletion. **Experimental Eye Research**, 85, n. 5, p. 617-625, 2007/11/01/2007.

CHEVOLET, I.; SPEECKAERT, R.; HASPELAGH, M.; NEYNS, B. *et al.* Peritumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression in melanoma: an early marker of resistance to immune control? **Br J Dermatol**, 171, n. 5, p. 987-995, Nov 2014.

CHOE, J. Y.; YUN, J. Y.; JEON, Y. K.; KIM, S. H. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is frequently expressed in stromal cells of Hodgkin lymphoma and is associated with adverse clinical features: a retrospective cohort study. **BMC Cancer**, 14, p. 335, May 15 2014.

CHUDNOVSKY, Y.; KHAVARI, P. A.; ADAMS, A. E. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. **J Clin Invest**, 115, n. 4, p. 813-824, Apr 2005.

CONWAY, R. M.; CHUA, W. C.; QURESHI, C.; BILLSON, F. A. Primary iris melanoma: diagnostic features and outcome of conservative surgical treatment. **Br J Ophthalmol**, 85, n. 7, p. 848-854, Jul 2001.

CORM, S.; BERTHON, C.; IMBENOTTE, M.; BIGGIO, V. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase activity of acute myeloid leukemia cells can be measured from patients' sera by HPLC and is inducible by IFN-gamma. **Leuk Res**, 33, n. 3, p. 490-494, Mar 2009.

DAMATO, B. Treatment of primary intraocular melanoma. **Expert Rev Anticancer Ther**, 6, n. 4, p. 493-506, Apr 2006.

DAMATO, B.; DOPIERALA, J. A.; COUPLAND, S. E. Genotypic Profiling of 452 Choroidal Melanomas with Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. **Clinical Cancer Research**, 16, n. 24, p. 6083-6092, 2010.

DAMATO, E. M.; DAMATO, B. E. Detection and time to treatment of uveal melanoma in the United Kingdom: an evaluation of 2,384 patients. **Ophthalmology**, 119, n. 8, p. 1582-1589, Aug 2012.

DAVIES, B. R.; LOGIE, A.; MCKAY, J. S.; MARTIN, P. *et al.* AZD6244 (ARRY-142886), a potent inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 1/2 kinases: mechanism of action in vivo, pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, and potential for combination in preclinical models. **Mol Cancer Ther**, 6, n. 8, p. 2209-2219, Aug 2007.

DOGRUSÖZ, M.; BAGGER, M.; VAN DUINEN, S. G.; KROES, W. G. *et al.* The Prognostic Value of AJCC Staging in Uveal Melanoma Is Enhanced by Adding Chromosome 3 and 8q Status. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 58, n. 2, p. 833-842, 2017.

DOGRUSÖZ, M.; JAGER, M. J.; DAMATO, B. Uveal Melanoma Treatment and Prognostication. **Asia Pac J Ophthalmol (Phila)**, 6, n. 2, p. 186-196, Mar-Apr 2017.

DUMMER, R.; HAUSCHILD, A.; GUGGENHEIM, M.; KEILHOLZ, U. *et al.* Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol**, 23 Suppl 7, p. vii86-91, Oct 2012.

DUNN, G. P.; BRUCE, A. T.; IKEDA, H.; OLD, L. J. *et al.* Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat Immunol**, 3, n. 11, p. 991-998, Nov 2002.

DUNN-PIRIO, A. M.; VLAHOVIC, G. Immunotherapy approaches in the treatment of malignant brain tumors. **Cancer**, 123, n. 5, p. 734-750, 2017.

DÄUBENER, W.; MACKENZIE, C. R. IFN-gamma activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism. **Adv Exp Med Biol**, 467, p. 517-524, 1999.

EINHORN, L. H.; BURGESS, M. A.; GOTTLIEB, J. A. Metastatic patterns of choroidal melanoma. **Cancer**, 34, n. 4, p. 1001-1004, 1974.

FEMIANO, F.; LANZA, A.; BUONAIUTO, C.; GOMBOS, F. *et al.* Oral malignant melanoma: a review of the literature. **J Oral Pathol Med**, 37, n. 7, p. 383-388, Aug 2008.

FOLBERG, R.; CHEN, X.; BOLDT, H. C.; PE'ER, J. *et al.* Microcirculation patterns other than loops and networks in choroidal and ciliary body melanomas. None of the investigators has any proprietary interest that could cause or be perceived to be a conflict of interest. **Ophthalmology**, 108, n. 5, p. 996-1001, 2001/05/01/ 2001.

FOLBERG, R.; RUMMELT, V.; PARYS-VAN GINDERDEUREN, R.; HWANG, T. *et al.* The prognostic value of tumor blood vessel morphology in primary uveal melanoma. **Ophthalmology**, 100, n. 9, p. 1389-1398, Sep 1993.

FOSS, A. J.; ALEXANDER, R. A.; HUNGERFORD, J. L.; HARRIS, A. L. *et al.* Reassessment of the PAS patterns in uveal melanoma. **Br J Ophthalmol**, 81, n. 3, p. 240-246; discussion 247-248, Mar 1997.

FORCE, T. A. O. O. T. International Validation of the American Joint Committee on Cancer's 7th Edition Classification of Uveal Melanoma. **JAMA Ophthalmology**, 133, n. 4, p. 376-383, 2015.

FOSS, A. J.; ALEXANDER, R. A.; JEFFERIES, L. W.; HUNGERFORD, J. L. *et al.* Microvessel count predicts survival in uveal melanoma. **Cancer Res**, 56, n. 13, p. 2900-2903, Jul 1 1996.

FRUMENTO, G.; ROTONDO, R.; TONETTI, M.; DAMONTE, G. *et al.* Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. **J Exp Med**, 196, n. 4, p. 459-468, Aug 19 2002.

FURDOVA, A.; STRMEN, P.; WACZULIKOVA, I.; CHORVATH, M. *et al.* One-day session LINAC-based stereotactic radiosurgery of posterior uveal melanoma. **Eur J Ophthalmol**, 22, n. 2, p. 226-235, Mar-Apr 2012.

GARON, E. B.; RIZVI, N. A.; HUI, R.; LEIGHL, N. *et al.* Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med**, 372, n. 21, p. 2018-2028, May 21 2015.

HAANEN, J. B. A. G.; BAARS, A.; GOMEZ, R.; WEDER, P. *et al.* Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival

in resected advanced-stage melanoma patients. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, 55, n. 4, p. 451-458, 2006/04/01 2006.

HARBOUR, J. W.; ROBERSON, E. D.; ANBUNATHAN, H.; ONKEN, M. D. *et al.* Recurrent mutations at codon 625 of the splicing factor SF3B1 in uveal melanoma. **Nat Genet**, 45, n. 2, p. 133-135, Feb 2013.

HAYASHI, T.; BECK, L.; ROSSETTO, C.; GONG, X. *et al.* Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. **J Clin Invest**, 114, n. 2, p. 270-279, Jul 2004.

HAINSWORTH, D. P.; SOMMERVILLE, D. N.; RANSON, N. T.; TODD, K. C. *et al.* Bruch's membrane abnormalities in dome-shaped and mushroom-shaped choroidal melanomas. **Ann Acad Med Singap**, 35, n. 2, p. 87-88, Feb 2006.

HODI, F. S.; O'DAY, S. J.; MCDERMOTT, D. F.; WEBER, R. W. *et al.* Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **N Engl J Med**, 363, n. 8, p. 711-723, Aug 19 2010.

HODI, F. S.; POSTOW, M. A.; CHESNEY, J. A.; PAVLICK, A. C. *et al.* Clinical response, progression-free survival (PFS), and safety in patients (pts) with advanced melanoma (MEL) receiving nivolumab (NIVO) combined with ipilimumab (IPI) vs IPI monotherapy in CheckMate 069 study. **Journal of Clinical Oncology**, 33, n. 15_suppl, p. 9004-9004, 2015.

HOLMGAARD, R. B.; ZAMARIN, D.; MUNN, D. H.; WOLCHOK, J. D. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. **J Exp Med**, 210, n. 7, p. 1389-1402, Jul 01 2013.

HU, D. N.; SIMON, J. D.; SARNA, T. Role of ocular melanin in ophthalmic physiology and pathology. **Photochem Photobiol**, 84, n. 3, p. 639-644, 2008 May-Jun 2008.

HÖGLUND, M.; GISSELSSON, D.; HANSEN, G. B.; WHITE, V. A. *et al.* Dissecting karyotypic patterns in malignant melanomas: temporal clustering of losses and gains in melanoma karyotypic evolution. **Int J Cancer**, 108, n. 1, p. 57-65, Jan 01 2004.

HÖNIG, A.; RIEGER, L.; KAPP, M.; SÜTTERLIN, M. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for maternal-fetal tolerance. **J Reprod Immunol**, 61, n. 2, p. 79-86, Apr 2004.

INFANTE, J. R.; FECHER, L. A.; FALCHOOK, G. S.; NALLAPAREDDY, S. *et al.* Safety, pharmacokinetic, pharmacodynamic, and efficacy data for the oral MEK inhibitor trametinib: a phase 1 dose-escalation trial. **Lancet Oncol**, 13, n. 8, p. 773-781, Aug 2012.

IVERSEN, T. Z. Immune modulations during chemoimmunotherapy & novel vaccine strategies--in metastatic melanoma and non small-cell lung cancer. **Dan Med J**, 60, n. 12, p. B4774, Dec 2013.

IVERSEN, T. Z.; ENGELL-NOERREGAARD, L.; ELLEBAEK, E.; ANDERSEN, R. *et al.* Long-lasting disease stabilization in the absence of toxicity in metastatic lung cancer patients vaccinated with an epitope derived from indoleamine 2,3 dioxygenase. **Clin Cancer Res**, 20, n. 1, p. 221-232, Jan 01 2014.

JACKSON, E.; DEES, E. C.; KAUH, J. S.; HARVEY, R. D. *et al.* A phase I study of indoximod in combination with docetaxel in metastatic solid tumors. **Journal of Clinical Oncology**, 31, n. 15_suppl, p. 3026-3026, 2013.

JAGER, M. J.; SHIELDS, C. L.; CEBULLA, C. M.; ABDEL-RAHMAN, M. H. *et al.* Uveal melanoma. **Nat Rev Dis Primers**, 6, n. 1, p. 24, 04 09 2020.

KALIKI, S.; SHIELDS, C. L. Uveal melanoma: relatively rare but deadly cancer. **Eye**, 31, n. 2, p. 241-257, 2017/02/01 2017.

KHEIR, W. J.; KIM, J. S.; MATERIN, M. A. Multiple Uveal Melanoma. **Ocular Oncology and Pathology**, 6, n. 5, p. 368-375, 2020.

KIVELÄ, T.; MÄKITIE, T.; AL-JAMAL, R. A. T.; TOIVONEN, P. Microvascular loops and networks in uveal melanoma. **Canadian Journal of Ophthalmology**, 39, n. 4, p. 409-421, 2004/06/01/ 2004.

KIVELÄ T, SIMPSON RE, GROSSNIKLAUS HE, ET AL. Uveal melanoma. **In: AJCC Cancer Staging Manual. 8th ed.** New York, NY: Springer; 2016:805-817

KLAUBER, S.; JENSEN, P. K.; PRAUSE, J. U.; KESSING, S. V. Surgical treatment of iris and ciliary body melanoma: follow-up of a 25-year series of patients. **Acta Ophthalmol**, 90, n. 2, p. 122-126, Mar 2012.

KOBLISH, H. K.; HANSBURY, M. J.; BOWMAN, K. J.; YANG, G. *et al.* Hydroxyamidine inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase potently suppress systemic tryptophan catabolism and the growth of IDO-expressing tumors. **Mol Cancer Ther**, 9, n. 2, p. 489-498, Feb 2010.

KOOPMANS, A. E.; VERDIJK, R. M.; BROUWER, R. W. W.; VAN DEN BOSCH, T. P. P. *et al.* Clinical significance of immunohistochemistry for detection of BAP1 mutations in uveal melanoma. **Modern Pathology**, 27, n. 10, p. 1321-1330, 2014/10/01 2014.

KOWAL, J.; STRZAŁKA, A.; MARKIEWICZ, A.; ROMANOWSKA-DIXON, B. *et al.* Bilateral choroidal melanoma--case analysis and literature review. **Klin Oczna**, 117, n. 2, p. 92-95, 2015.

KUJALA, E.; MÄKITIE, T.; KIVELÄ, T. Very long-term prognosis of patients with malignant uveal melanoma. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 44, n. 11, p. 4651-4659, Nov 2003.

KUPHAL, S.; BOSSERHOFF, A. Recent progress in understanding the pathology of malignant melanoma. **J Pathol**, 219, n. 4, p. 400-409, Dec 2009.

LAIMER, K.; TROESTER, B.; KLOSS, F.; SCHAFER, G. *et al.* Expression and prognostic impact of indoleamine 2,3-dioxygenase in oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncology**, 47, n. 5, p. 352-357, 2011/05/01/ 2011.

LANDREVILLE, S.; AGAPOVA, O. A.; MATATALL, K. A.; KNEASS, Z. T. *et al.* Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest and differentiation in uveal melanoma. **Clin Cancer Res**, 18, n. 2, p. 408-416, Jan 15 2012.

LANE, A. M.; KIM, I. K.; GRAGOUDAS, E. S. Long-term Risk of Melanoma-Related Mortality for Patients With Uveal Melanoma Treated With Proton Beam Therapy. **JAMA Ophthalmol**, 133, n. 7, p. 792-796, Jul 2015.

LEE, J. R.; DALTON, R. R.; MESSINA, J. L.; SHARMA, M. D. *et al.* Pattern of recruitment of immunoregulatory antigen-presenting cells in malignant melanoma. **Lab Invest**, 83, n. 10, p. 1457-1466, Oct 2003.

LI, M.; BOLDUC, A. R.; HODA, M. N.; GAMBLE, D. N. *et al.* The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway controls complement-dependent enhancement of chemo-radiation therapy against murine glioblastoma. **J Immunother Cancer**, 2, p. 21, 2014.

LI, Y.; TREDGET, E. E.; GHAFFARI, A.; LIN, X. *et al.* Local expression of indoleamine 2,3-dioxygenase protects engraftment of xenogeneic skin substitute. **J Invest Dermatol**, 126, n. 1, p. 128-136, Jan 2006.

LIANG, C.; PENG, L.; ZENG, S.; ZHAO, Q. *et al.* Investigation of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 expression in uveal melanoma. **Experimental Eye Research**, 181, p. 112-119, 2019/04/01/ 2019.

LIU, X.; SHIN, N.; KOBLISH, H. K.; YANG, G. *et al.* Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity. **Blood**, 115, n. 17, p. 3520-3530, Apr 29 2010.

LIU, X.-Q.; LU, K.; FENG, L.-L.; DING, M. *et al.* Up-regulated expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 in non-Hodgkin lymphoma correlates with increased regulatory T-cell infiltration. **Leukemia & Lymphoma**, 55, n. 2, p. 405-414, 2014/02/01 2014.

LUCENA, E.; GOLDEMBERG, D. C.; THULER, L. C. S.; DE MELO, A. C. Epidemiology of uveal melanoma in Brazil. **International Journal of Retina and Vitreous**, 6, n. 1, p. 51, 2020/11/11 2020.

LUO, J.; ZHANG, C.; YANG, Y.; XIU, J. *et al.* Characteristics, Treatments, and Survival of Uveal Melanoma: A Comparison between Chinese and American Cohorts. **Cancers**, v.14, n. 16, DOI: 10.3390/cancers14163960.

MAHENDRARAJ, K.; LAU, C. S.; LEE, I.; CHAMBERLAIN, R. S. Trends in incidence, survival, and management of uveal melanoma: a population-based study of 7,516 patients from the

Surveillance, Epidemiology, and End Results database (1973-2012). **Clin Ophthalmol**, 10, p. 2113-2119, 2016.

MALINA, H. Z.; MARTIN, X. D. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the aqueous humor, iris/ciliary body, and retina of the bovine eye. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, 231, n. 8, p. 482-486, Aug 1993.

MÄKITIE, T.; SUMMANEN, P.; TARKKANEN, A.; KIVELÄ, T. Microvascular Density in Predicting Survival of Patients with Choroidal and Ciliary Body Melanoma. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 40, n. 11, p. 2471-2480, 1999.

MARIANI, P.; PIPERNO-NEUMANN, S.; SERVOIS, V.; BERRY, M. G. *et al.* Surgical management of liver metastases from uveal melanoma: 16 years' experience at the Institut Curie. **European Journal of Surgical Oncology**, 35, n. 11, p. 1192-1197, 2009.

MARTIN, M.; MAßHÖFER, L.; TEMMING, P.; RAHMANN, S. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in EIF1AX and SF3B1 in uveal melanoma with disomy 3. **Nat Genet**, 45, n. 8, p. 933-936, Aug 2013.

MASAKI, A.; ISHIDA, T.; MAEDA, Y.; SUZUKI, S. *et al.* Prognostic Significance of Tryptophan Catabolism in Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. **Clin Cancer Res**, 21, n. 12, p. 2830-2839, Jun 15 2015.

MASHAYEKHI, A.; TUNCER, S.; SHIELDS, C. L.; SHIELDS, J. A. Tumor-related Lipid Exudation after Plaque Radiotherapy of Choroidal Melanoma: The Role of Bruch's Membrane Rupture. **Ophthalmology**, 117, n. 5, p. 1013-1023, 2010.

MAUTINO, M. R.; JAIPURI, F. A.; WALDO, J.; KUMAR, S. *et al.* Abstract 491: NLG919, a novel indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO)-pathway inhibitor drug candidate for cancer therapy. **Cancer Research**, 73, n. 8_Supplement, p. 491-491, 2013.

MCLAUGHLIN, C. C.; WU, X. C.; JEMAL, A.; MARTIN, H. J. *et al.* Incidence of noncutaneous melanomas in the U.S. **Cancer**, 103, n. 5, p. 1000-1007, Mar 1 2005.

MCLEAN, I. W.; FOSTER, W. D.; ZIMMERMAN, L. E. Uveal melanoma: location, size, cell type, and enucleation as risk factors in metastasis. **Hum Pathol**, 13, n. 2, p. 123-132, Feb 1982.

MCLEAN, I. W.; FOSTER, W. D.; ZIMMERMAN, L. E.; GAMEL, J. W. Modifications of Callender's classification of uveal melanoma at the Armed Forces Institute of Pathology. **Am J Ophthalmol**, 96, n. 4, p. 502-509, Oct 1983.

MCLEAN, M. J.; FOSTER, W. D.; ZIMMERMAN, L. E. Prognostic factors in small malignant melanomas of choroid and ciliary body. **Arch Ophthalmol**, 95, n. 1, p. 48-58, Jan 1977.

MELLOR, A. L.; CHANDLER, P.; LEE, G. K.; JOHNSON, T. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase, immunosuppression and pregnancy. **J Reprod Immunol**, 57, n. 1-2, p. 143-150, 2002 Oct-Nov 2002.

MITSUKA, K.; KAWATAKI, T.; SATOH, E.; ASAHARA, T. *et al.* Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and correlation with pathological malignancy in gliomas. **Neurosurgery**, 72, n. 6, p. 1031-1038; discussion 1038-1039, Jun 2013.

MONDAL, A.; SMITH, C.; DUHADAWAY, J. B.; SUTANTO-WARD, E. *et al.* IDO1 is an Integral Mediator of Inflammatory Neovascularization. **EBioMedicine**, 14, p. 74-82, Dec 2016.

MOSKOWITZ, C. H.; RIBRAG, V.; MICHOT, J.-M.; MARTINELLI, G. *et al.* PD-1 Blockade with the Monoclonal Antibody Pembrolizumab (MK-3475) in Patients with Classical Hodgkin Lymphoma after Brentuximab Vedotin Failure: Preliminary Results from a Phase 1b Study (KEYNOTE-013). **Blood**, 124, n. 21, p. 290, 2014/12/06/ 2014.

MOTZER, R. J.; ESCUDIER, B.; GEORGE, S.; HAMMERS, H. J. *et al.* Nivolumab versus everolimus in patients with advanced renal cell carcinoma: Updated results with long-term follow-up of the randomized, open-label, phase 3 CheckMate 025 trial. **Cancer**, 126, n. 18, p. 4156-4167, 09 15 2020.

MOTZER, R. J.; ESCUDIER, B.; MCDERMOTT, D. F.; GEORGE, S. *et al.* Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. **N Engl J Med**, 373, n. 19, p. 1803-1813, Nov 5 2015.

MUELLER, A. J.; MANIOTIS, A. J.; FREEMAN, W. R.; BARTSCH, D.-U. *et al.* An Orthotopic Model for Human Uveal Melanoma in SCID Mice. **Microvascular Research**, 64, n. 2, p. 207-213, 2002/09/01/ 2002.

MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. **J Clin Invest**, 117, n. 5, p. 1147-1154, May 2007.

MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. **Trends Immunol**, 34, n. 3, p. 137-143, Mar 2013.

MUNN, D. H.; ZHOU, M.; ATTWOOD, J. T.; BONDAREV, I. *et al.* Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. **Science**, 281, n. 5380, p. 1191-1193, Aug 21 1998.

NATHAN, P.; COHEN, V.; COUPLAND, S.; CURTIS, K. *et al.* Uveal Melanoma UK National Guidelines. **Eur J Cancer**, 51, n. 16, p. 2404-2412, Nov 2015.

OLIVA, M.; RULLAN, A. J.; PIULATS, J. M. Uveal melanoma as a target for immune-therapy. **Ann Transl Med**, 4, n. 9, p. 172, May 2016.

ONKEN, M. D.; WORLEY, L. A.; LONG, M. D.; DUAN, S. *et al.* Oncogenic mutations in GNAQ occur early in uveal melanoma. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 49, n. 12, p. 5230-5234, Dec 2008.

ONKEN, M. D.; WORLEY, L. A.; CHAR, D. H.; AUGSBURGER, J. J. *et al.* Collaborative Ocular Oncology Group report number 1: prospective validation of a multi-gene prognostic assay in uveal melanoma. **Ophthalmology**, 119, n. 8, p. 1596-1603, Aug 2012.

ONKEN, M. D.; WORLEY, L. A.; TUSCAN, M. D.; HARBOUR, J. W. An Accurate, Clinically Feasible Multi-Gene Expression Assay for Predicting Metastasis in Uveal Melanoma. **The Journal of Molecular Diagnostics**, 12, n. 4, p. 461-468, 2010.

PALLOTTA, M. T.; ORABONA, C.; VOLPI, C.; VACCA, C. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. **Nat Immunol**, 12, n. 9, p. 870-878, Jul 31 2011.

PAN, K.; WANG, H.; CHEN, M. S.; ZHANG, H. K. *et al.* Expression and prognosis role of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocellular carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol**, 134, n. 11, p. 1247-1253, Nov 2008.

PEREIRA, P. R.; ODASHIRO, A. N.; LIM, L. A.; MIYAMOTO, C. *et al.* Current and emerging treatment options for uveal melanoma. **Clin Ophthalmol**, 7, p. 1669-1682, 2013.

PIPERNO-NEUMANN, S.; DIALLO, A.; ETIENNE-GRIMALDI, M. C.; BIDARD, F. C. *et al.* Phase II Trial of Bevacizumab in Combination With Temozolomide as First-Line Treatment in Patients With Metastatic Uveal Melanoma. **Oncologist**, 21, n. 3, p. 281-282, Mar 2016.

PIULATS, J. M.; ESPINOSA, E.; DE LA CRUZ MERINO, L.; VARELA, M. *et al.* Nivolumab Plus Ipilimumab for Treatment-Naïve Metastatic Uveal Melanoma: An Open-Label, Multicenter, Phase II Trial by the Spanish Multidisciplinary Melanoma Group (GEM-1402). **J Clin Oncol**, 39, n. 6, p. 586-598, Feb 20 2021.

PLATTEN, M.; HO, P. P.; YOUSSEF, S.; FONTOURA, P. *et al.* Treatment of autoimmune neuroinflammation with a synthetic tryptophan metabolite. **Science**, 310, n. 5749, p. 850-855, Nov 04 2005.

PLATTEN, M.; WICK, W.; VAN DEN EYNDE, B. J. Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion. **Cancer Res**, 72, n. 21, p. 5435-5440, Nov 01 2012.

POLAK, M. E.; BORTHWICK, N. J.; GABRIEL, F. G.; JOHNSON, P. *et al.* Mechanisms of local immunosuppression in cutaneous melanoma. **Br J Cancer**, 96, n. 12, p. 1879-1887, Jun 18 2007.

PONS, F.; PLANA, M.; CAMINAL, J. M.; PERA, J. *et al.* Metastatic uveal melanoma: is there a role for conventional chemotherapy? - A single center study based on 58 patients. **Melanoma Res**, 21, n. 3, p. 217-222, Jun 2011.

POPOVIC, M.; AHMED, I. I. K.; DIGIOVANNI, J.; SHIELDS, C. L. Radiotherapeutic and surgical management of iris melanoma: A review. **Surv Ophthalmol**, 62, n. 3, p. 302-311, 2017 May - Jun 2017.

POSTOW, M. A.; KUK, D.; BOGATCH, K.; CARVAJAL, R. D. Assessment of overall survival from time of metastasis in mucosal, uveal, and cutaneous melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, 32, n. 15_suppl, p. 9074-9074, 2014.

PRENDERGAST, G. C. Immune escape as a fundamental trait of cancer: focus on IDO. **Oncogene**, 27, n. 28, p. 3889-3900, 2008/06/01 2008.

RAZZAQ, L. A. K., R. J. W. **Ruthenium plaque radiation for iris and iridociliary melanomas: development of dry eyes?** *Br J Ophthalmol* p.2. 2010.

ROBERTS, P. J.; STINCHCOMBE, T. E. KRAS mutation: should we test for it, and does it matter? **J Clin Oncol**, 31, n. 8, p. 1112-1121, Mar 10 2013.

ROSSI, E.; PAGLIARA, M. M.; ORTESCHI, D.; DOSA, T. *et al.* Pembrolizumab as first-line treatment for metastatic uveal melanoma. **Cancer Immunol Immunother**, 68, n. 7, p. 1179-1185, Jul 2019.

ROSSI, E.; ZIZZARI, I.; DI FILIPPO, A.; ACAMPORA, A. *et al.* **Immune Profile Of Uveal Melanoma Patients: Impact On Clinical Outcome.** 2021.

SARAIVA, V. S.; CAISSIE, A. L.; SEGAL, L.; EDELSTEIN, C. *et al.* Immunohistochemical expression of phospho-Akt in uveal melanoma. **Melanoma Res**, 15, n. 4, p. 245-250, Aug 2005.

SCHINZARI, G.; ROSSI, E.; CASSANO, A.; DADDUZIO, V. *et al.* Cisplatin, dacarbazine and vinblastine as first line chemotherapy for liver metastatic uveal melanoma in the era of immunotherapy: a single institution phase II study. **Melanoma Res**, 27, n. 6, p. 591-595, Dec 2017.

SEDDON, J. M.; ALBERT, D. M.; LAVIN, P. T.; ROBINSON, N. A prognostic factor study of disease-free interval and survival following enucleation for uveal melanoma. **Arch Ophthalmol**, 101, n. 12, p. 1894-1899, Dec 1983.

SELLAM, A.; DESJARDINS, L.; BARNHILL, R.; PLANCHER, C. *et al.* Fine Needle Aspiration Biopsy in Uveal Melanoma: Technique, Complications, and Outcomes. **Am J Ophthalmol**, 162, p. 28-34.e21, Feb 2016.

SHAH, A. A.; DAVID BOURNE, T.; MURALI, R. BAP1 protein loss by immunohistochemistry: A potentially useful tool for prognostic prediction in patients with uveal melanoma. **Pathology**, 45, n. 7, p. 651-656, 2013.

SHAMMAS, H. F.; BLODI, F. C. Prognostic factors in choroidal and ciliary body melanomas. **Arch Ophthalmol**, 95, n. 1, p. 63-69, Jan 1977.

SHIELDS, C. L.; FURUTA, M.; THANGAPPAN, A.; NAGORI, S. *et al.* Metastasis of uveal melanoma millimeter-by-millimeter in 8033 consecutive eyes. **Arch Ophthalmol**, 127, n. 8, p. 989-998, Aug 2009.

SHIELDS, C. L.; KALIKI, S.; HUTCHINSON, A.; NICKERSON, S. *et al.* Iris nevus growth into melanoma: analysis of 1611 consecutive eyes: the ABCDEF guide. **Ophthalmology**, 120, n. 4, p. 766-772, Apr 2013.

SHIELDS, C. L.; KALIKI, S.; FURUTA, M.; MASHAYEKHI, A. *et al.* Clinical spectrum and prognosis of uveal melanoma based on age at presentation in 8,033 cases. **Retina**, 32, n. 7, p. 1363-1372, Jul 2012.

SHIELDS, C. L.; KALIKI, S.; HUTCHINSON, A.; NICKERSON, S. *et al.* Iris nevus growth into melanoma: analysis of 1611 consecutive eyes: the ABCDEF guide. **Ophthalmology**, 120, n. 4, p. 766-772, Apr 2013.

SHIELDS, C. L.; RAMASUBRAMANIAN, A.; GANGULY, A.; MOHAN, D. *et al.* Cytogenetic testing of iris melanoma using fine needle aspiration biopsy in 17 patients. **Retina**, 31, n. 3, p. 574-580, Mar 2011.

SIEGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2014. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 64, n. 1, p. 9-29, 2014.

SINGH, A. D.; TURELL, M. E.; TOPHAM, A. K. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. **Ophthalmology**, 118, n. 9, p. 1881-1885, Sep 2011.

SMITH, S. H.; GOLDSCHMIDT, M. H.; MCMANUS, P. M. A comparative review of melanocytic neoplasms. **Vet Pathol**, 39, n. 6, p. 651-678, Nov 2002.

SOLIMAN, H.; RAWAL, B.; FULP, J.; LEE, J. H. *et al.* Analysis of indoleamine 2-3 dioxygenase (IDO1) expression in breast cancer tissue by immunohistochemistry. **Cancer Immunol Immunother**, 62, n. 5, p. 829-837, May 2013.

SOLIMAN, H. H.; MINTON, S. E.; HAN, H. S.; ISMAIL-KHAN, R. *et al.* A phase I study of indoximod in patients with advanced malignancies. **Oncotarget**, 7, n. 16, p. 22928-22938, Apr 19 2016.

SPAGNOLO, F.; GROSSO, M.; PICASSO, V.; TORNARI, E. *et al.* Treatment of metastatic uveal melanoma with intravenous fotemustine. **Melanoma Res**, 23, n. 3, p. 196-198, Jun 2013.

STÅLHAMMAR, G.; SEREGARD, S.; GROSSNIKLAUS, H. E. Expression of immune checkpoint receptors Indoleamine 2,3-dioxygenase and T cell Ig and ITIM domain in metastatic versus nonmetastatic choroidal melanoma. **Cancer Med**, 8, n. 6, p. 2784-2792, Jun 2019.

SZALAI, E.; JIANG, Y.; VAN POPPELEN, N. M.; JAGER, M. J. *et al.* Association of Uveal Melanoma Metastatic Rate With Stochastic Mutation Rate and Type of Mutation. **JAMA Ophthalmol**, 136, n. 10, p. 1115-1120, Oct 1 2018.

TAKIKAWA, O.; HABARA-OHKUBO, A.; YOSHIDA, R. Induction of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Tumor Cells Transplanted into Allogeneic Mouse: Interferon- γ is the Inducer. *In*: SCHWARCZ, R.; YOUNG, S. N., *et al.* (Ed.). **Kynurenine and Serotonin Pathways: Progress in Tryptophan Research**. Boston, MA: Springer New York, 1991. p. 437-444.

TAKIKAWA, O.; TAGAWA, Y.; IWAKURA, Y.; YOSHIDA, R. *et al.* Interferon-gamma-dependent/independent expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. Studies with interferon-gamma-knockout mice. **Adv Exp Med Biol**, 467, p. 553-557, 1999.

TANIMOTO, T.; HORI, A.; KAMI, M. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. **N Engl J Med**, 363, n. 20, p. 1966; author reply 1967-1968, 11 11 2010.

TERNESS, P.; BAUER, T. M.; RÖSE, L.; DUFTER, C. *et al.* Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. **J Exp Med**, 196, n. 4, p. 447-457, Aug 19 2002.

The COMS randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma: V. Twelve-year mortality rates and prognostic factors: COMS report No. 28. **Arch Ophthalmol**, 124, n. 12, p. 1684-1693, Dec 2006.

THOMAS, S.; PÜTTER, C.; WEBER, S.; BORNFELD, N. *et al.* Prognostic significance of chromosome 3 alterations determined by microsatellite analysis in uveal melanoma: a long-term follow-up study. **Br J Cancer**, 106, n. 6, p. 1171-1176, Mar 13 2012.

TOPP, M. S.; GÖKBUGET, N.; ZUGMAIER, G.; KLAPPERS, P. *et al.* Phase II Trial of the Anti-CD19 Bispecific T Cell-Engager Blinatumomab Shows Hematologic and Molecular Remissions in Patients With Relapsed or Refractory B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, 32, n. 36, p. 4134-4140, 2014.

UYTTENHOVE, C.; PILOTTE, L.; THÉATE, I.; STROOBANT, V. *et al.* Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. **Nat Med**, 9, n. 10, p. 1269-1274, Oct 2003.

VAN RAAMSDONK, C. D.; BEZROOKOVE, V.; GREEN, G.; BAUER, J. *et al.* Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. **Nature**, 457, n. 7229, p. 599-602, Jan 29 2009.

VAN RAAMSDONK, C. D.; GRIEWANK, K. G.; CROSBY, M. B.; GARRIDO, M. C. *et al.* Mutations in GNA11 in uveal melanoma. **N Engl J Med**, 363, n. 23, p. 2191-2199, Dec 02 2010.

VERBIK, D. J.; MURRAY, T. G.; TRAN, J. M.; KSANDER, B. R. Melanomas that develop within the eye inhibit lymphocyte proliferation. **Int J Cancer**, 73, n. 4, p. 470-478, Nov 14 1997.

XU, Y.; LOU, L.; WANG, Y.; MIAO, Q. *et al.* Epidemiological Study of Uveal Melanoma from US Surveillance, Epidemiology, and End Results Program (2010-2015). **J Ophthalmol**, 2020, p. 3614039, 2020.

WANG, X.-X.; SUN, S.-Y.; DONG, Q.-Q.; WU, X.-X. *et al.* Recent advances in the discovery of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitors. **MedChemComm**, 10, n. 10, p. 1740-1754, 2019. 10.1039/C9MD00208A.

WEI, L.; ZHU, S.; LI, M.; LI, F. *et al.* High Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is Correlated With Microvessel Density and Worse Prognosis in Breast Cancer. **Front Immunol**, 9, p. 724, 2018.

WEIS, E.; SHAH, C. P.; LAJOUS, M.; SHIELDS, J. A. *et al.* The association between host susceptibility factors and uveal melanoma: a meta-analysis. **Arch Ophthalmol**, 124, n. 1, p. 54-60, Jan 2006.

YAKES, F. M.; CHEN, J.; TAN, J.; YAMAGUCHI, K. *et al.* Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth. **Mol Cancer Ther**, 10, n. 12, p. 2298-2308, Dec 2011.

YANG, H.; JAGER, M. J.; GROSSNIKLAUS, H. E. Bevacizumab suppression of establishment of micrometastases in experimental ocular melanoma. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 51, n. 6, p. 2835-2842, Jun 2010.

YEH, T. C.; MARSH, V.; BERNAT, B. A.; BALLARD, J. *et al.* Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor. **Clin Cancer Res**, 13, n. 5, p. 1576-1583, Mar 01 2007.

YEUNG, A. W.; TARENTIS, A. C.; KING, N. J.; THOMAS, S. R. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in health and disease. **Clin Sci (Lond)**, 129, n. 7, p. 601-672, Oct 2015.

ZHAI, L.; LADOMERSKY, E.; LENZEN, A.; NGUYEN, B. *et al.* IDO1 in cancer: a Gemini of immune checkpoints. **Cellular & Molecular Immunology**, 15, n. 5, p. 447-457, 2018/05/01 2018.

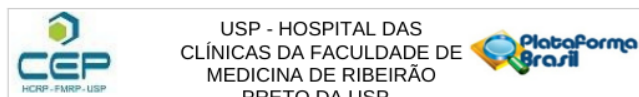
ZIMMER, L.; VAUBEL, J.; MOHR, P.; HAUSCHILD, A. *et al.* Phase II DeCOG-study of ipilimumab in pretreated and treatment-naïve patients with metastatic uveal melanoma. **PLoS One**, 10, n. 3, p. e0118564, 2015.

ZULFIQAR, B.; MAHROO, A.; NASIR, K.; FAROOQ, R. K. *et al.* Nanomedicine and cancer immunotherapy: focus on indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors. **Onco Targets Ther**, 10, p. 463-476, 2017. ANGI, M.; KALIRAI, H.; TAKTAK, A.; HUSSAIN, R. *et al.* Prognostic biopsy of

choroidal melanoma: an optimised surgical and laboratory approach. **British Journal of Ophthalmology**, 101, n. 8, p. 1143, 2017

ANEXO

Anexo A – Parecer de aprovação do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Melanoma Uveal: Estudo Imunohistoquímico e molecular da indoleamina 2,3-dioxigenase

Pesquisador: FREDERICO GUILHERME FREITAS LOBAO RODRIGUES GOMES

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 24772619.0.0000.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.681.266

Apresentação do Projeto:

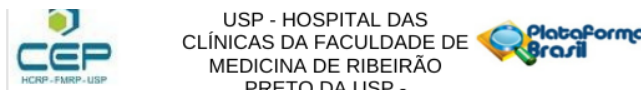
O melanoma uveal é o câncer intraocular mais comum, e corresponde a 85% de todos os melanomas oculares, e até 50% dos pacientes desenvolvem doença metastásica. Detectadas metástases, a sobrevida é de 6 meses na ausência de tratamento. Não há evidências para qual seja o tratamento mais adequado para esses casos. Por isso, torna-se necessária a realização de novos estudos que evidenciem fatores com valor preditivo e possibilidades terapêuticas. As células de melanomas utilizam estratégias para realizar evasão imunológica. A enzima indoleamina-2,3 dioxigenase (IDO) é expressa por alguns tipos celulares e também por células tumorais. Esta enzima atua inibindo a proliferação de linfócitos T, comprometendo a atividade citotóxica dos mesmos. As células de melanoma uveal são estimuladores pobres da proliferação de linfócitos alogênicos, sugerindo que possam gerar um microambiente tumoral hostil à proliferação de linfócitos T específicos. Desta forma, a expressão de IDO pelos melanomas uveais pode afetar as estratégias imunoterapêuticas baseadas em células T e IFN-.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase, em conjunto com dados epidemiológicos e histopatológicos, em amostras de melanomas uveais provenientes do serviço de patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: UF: SP Município: RIBEIRÃO 14.048-900
PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Página 01 de 05



Continuação do Parecer: 3.681.266

solicitação de dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Informações Básicas do Projeto	Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Aut	Situação
8B_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P0111/2019	Formulário	Projeto	14/29/59		
14:29:37	Folha UPC_Cajim	11/11/2019	FREderico		
RODRIGUES					
7	Termos de solicitação	31/10/2019	FREderico		
Assentimento /15:23:44					
Justificativa de					
Ausência					
Orçamento tabela de	Orçamento.docx	31/10/2019	FREderico		
01:56:51					
RODRIGUES					
Projeto Detalhado /pro	pro_doc_etica.docx	31/10/2019	FREderico		
Brochura 01:27:01					
Investigador					
RODRIGUES					
Folha de Rosto /folha	folha_rosto.pdf	30/10/2019	FREderico		
16:24:09					
RODRIGUES					

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: UF: SP Município: RIBEIRÃO 14.048-900
PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Página 04 de 05

