

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Fisiopatologia

**Indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) em melanoma: regulação frente ao  
inibidor de BRAF e sua expressão na progressão da doença**

Luis Roberto Masao Watanabe

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Silvy Maria-Engler

**São Paulo**  
**2019**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Fisiopatologia

**Indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) em melanoma: regulação frente ao  
inibidor de BRAF e sua expressão na progressão da doença**

Luis Roberto Masao Watanabe

Versão Original

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Silvy Maria-Engler

**São Paulo**  
**2019**

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 eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

WW324i Watanabe, Luis Roberto Masao  
Indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) em melanoma:  
regulação frente ao inibidor de BRAF e sua expressão  
na progressão da doença / Luis Roberto Masao  
Watanabe. - São Paulo, 2019.  
108 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.  
Orientador: Maria-Engler, Silvy Stuchi

1. Melanoma. 2. Resistência. 3. Indolamina 2,3-  
dioxigenase (IDO). I. T. II. Maria-Engler, Silvy  
Stuchi, orientador.

Luis Roberto Masao Watanabe

**Indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) em melanoma: regulação frente ao  
inibidor de BRAF e sua expressão na progressão da doença**

Comissão Julgadora da  
Dissertação para obtenção de título de Mestre

Profa. Dra. Silvyta Stuchi Maria-Engler  
Orientadora/ Presidente

---

1° examinador

---

2° examinador

---

3° examinador

---

4° examinador

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019.

Dedico este trabalho ao meu pai Roberto Teruo Watanabe  
que me iluminou nessa jornada de diversas maneiras.

Dedico também a minha mãe Magda e minha irmã Mari  
por todo amor e carinho despendido em mim.

E por fim, dedico a linda família que construí: melhor  
esposa do mundo, Karen e meus filhos Diego e  
Luisa por me tornarem uma pessoa melhor e  
principalmente, mais feliz! =)

## AGRADECIMENTOS

Quando nos tornamos gratos e paramos de simplesmente reclamar e apontar o que está ruim, o universo começa a conspirar mais ao nosso favor e as coisas começam a se tornar naturalmente mais simples e leves. Por isso, agradeço:

À minha mãe, Magda, minha irmã, Mari e minha esposa, Karen, pelo suporte – tanto financeiro quanto emocional.

À minha mãe por cuidar do Diego, pelas jantãs feitas e simplesmente pelo amor de mãe.

À minha irmã por ser sempre acreditar em mim, ser muitas vezes a ponte com a mãe e ser inspiração de sucesso.

À minha esposa por sempre me ouvir, por não desistir de mim e pelo pacote completo que é: esposa, profissional e mãe – fazendo tudo com perfeição.

Ao meu filho, por me mostrar a felicidade no modo mais puro e por, a cada dia, extrair o melhor de mim.

À minha orientadora, Profa. Silvyta Stuchi Maria-Engler, por me receber de braços abertos neste grupo que faz ciência com excelência e paixão e pelas palavras de suporte, incentivo e reconhecimento durante estes anos.

À minha co-orientadora extra-oficial, Silvana Sandri, por permitir continuar este projeto e por todo suporte, ajuda e discussão nestes anos.

À Silvia Romano de Assis, mãe coruja do Flavio, por me ensinar simplesmente tudo em cultura de célula. E também, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação ao lab. E claro, pelas histórias compartilhadas e companheirismo nestes anos.

À Profa. Carlota de Oliveira Rangel Yagui, por plantar a sementinha da ciência em 2007 quando fiz minha iniciação científica.

À Profa. Silvia Berlanga de Moraes Barros, por compartilhar sua experiência e sabedoria.

A todos que caminharam comigo nessa jornada: Érica, Dani Seo, Lari Carvalho, Débora, Lari Sekimoto, Denisse, Michele, Stephanie, Vanessa, Bárbara, Adriana, Juliana, por me ensinarem a enfrentar uma bancada, pelos momentos descontraídos e pela companhia do dia a dia.

À Profa. Dra. Márcia Edilaine Lopes Consolaro, da UEM, pela colaboração com as amostras de melanoma de pacientes.

Ao Prof. Dr. Aloísio Souza Felipe da Silva, Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do HU-USP, pela colaboração na avaliação e análise das lâminas de IHQ.

Ao Edson Naoto Makiyama (ou simplesmente Naoto – como o conheci no gakko de Taboão - CECT), pelo uso do revelador de Western Blotting e do microscópio.

À Silene Migliorini, mãe do craque Vini, pelas análises de HPLC, pelas conversas e pela alegria transmitida.

Ao Walter Turato, fã do Ford Mustang, pelas análises do ensaio clonogênico.

Aos meus amigos unidos pela pelota, Taka, Jun, Jody e Tarso, pelo fut jogado, pela ceva consumida e pela resenha de sempre.

À minha prima Diany Nakamura, por clarear caminhos obscuros com sua sabedoria e seu dom.

Aos meus antepassados, por simplesmente permitir a minha existência.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas, ou simplesmente FARMA, minha segunda casa desde 2005!

E claro, à CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

**MUITO OBRIGADO! THANK YOU VERY MUCH! MUCHAS GRACÍAS!  
ARIGATOU GOZAIMASSU! DANKE VIELMALS! TODÁ RABÁ!**

“Eu errei mais de 9.000 arremessos na minha carreira. Perdi quase 300 jogos. Em 26 oportunidades, confiaram em mim para fazer o arremesso da vitória e eu errei. Eu falhei muitas e muitas vezes na minha vida. E é por isso que tenho sucesso.”

Michael Jordan

## RESUMO

WATANABE, L.R.M. **Indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) em melanoma: regulação frente ao inibidor de BRAF e sua expressão na progressão da doença.** 2019. 108f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Os inibidores de BRAF (iBRAFs) e de MEK (iMEK), inauguraram uma nova classe de medicamentos, a terapia direcionada, no combate ao melanoma metastático. Entretanto, os pacientes adquirem resistência ao tratamento em poucos meses. Além disso, a imunoterapia vem ganhando espaço no tratamento do câncer, incluindo o melanoma, porém, com alguns aspectos inexplorados. Dentro deste tema, a enzima IDO vem despertando um grande interesse pela participação nos mecanismos de imunotolerância, imunoescape e progressão tumoral. A IDO é responsável pelo consumo e depleção do triptofano, produzindo a quinurenina. Ela está presente em diversos tipos celulares, incluindo células do sistema imune e células tumorais. Este trabalho objetivou avaliar a expressão de IDO durante a progressão da doença – desde do nevo até o melanoma metastático e também avaliar a regulação de IDO induzido por IFN- $\gamma$  após tratamento com iBRAf em linhagens parentais e resistentes ao iBRAf, buscando-se os mecanismos moleculares. Por fim, objetivou-se entender os efeitos do 1-metil-triptofano (1-MT), um inibidor de IDO, tanto na sua capacidade de inibir a atividade de IDO quanto na sua influência na capacidade clonogênica. O estudo de bioinformática sobre o repositório público GSE12391 mostrou que o nível de expressão gênica de IDO foi superior nos estágios mais avançados da doença. Além disso, todas as amostras de melanoma primário de pacientes apresentaram a imunomarcagem de IDO, enquanto que nenhuma amostra de nevo apresentou tal marcação. Adicionalmente, a ocorrência de IDO se deu nos infiltrados linfóides, em células mononucleares do sistema imune. Duas análises de bioinformática de expressão gênica demonstraram que a IDO estava expressa positivamente na fase de resistência ao iBRAf. Ademais, os resultados de expressão proteica mostraram que a inibição de via MAPK (tanto por iBRAf quanto por iMEK) conseguiu modular a expressão de IDO, sendo que a maioria das linhagens apresentou uma diminuição de IDO. A atividade de IDO, medida através da produção de quinurenina, por HPLC se mostrou em consonância com os resultados de expressão proteica, exceto pela linhagem WM164 que não apresentou atividade enzimática, embora a proteína estivesse presente. Por fim, o 1-MT conseguiu inibir de maneira eficiente a enzima IDO, bloqueando a produção de quinurenina. Além de que, o 1-MT reduziu a capacidade clonogênica de maneira dose-dependente. Portanto, conclui-se que a expressão de IDO é crescente conforme a progressão do melanoma, que a inibição da via MAPK regulou a expressão de IDO e que o 1-MT reduz a capacidade clonogênica, além da sua função primária de inibir IDO.

**Palavras-chaves:** melanoma, resistência, indolamina 2,3-dioxigenase (IDO).

## ABSTRACT

WATANABE, L.R.M. **Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in melanoma: regulation against BRAF inhibitor and its expression in disease progression.** 2019. 108f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

BRAF and MEK inhibitors (BRAFi and MEKi) has launched a new class of medication, the target therapy, to combat metastatic melanoma. Nevertheless, patients acquired resistance to the treatment in few months. Additionally, immunotherapy has been gaining space in cancer treatment, including melanoma, but some aspects need to be explored. Inside this theme, IDO enzyme has called the attention due to its participation in the mechanisms of immune tolerance, scape and tumor progression. IDO is responsible for tryptophan consume e depletion, producing kynurenine. It is present in different cells, including cells from immune system and tumor cells. This work purposed evaluate IDO expression during disease progression – since nevus until metastatic melanoma and also, evaluate IFN- $\gamma$ -induced IDO regulation after BRAFi treatment in parental and resistant melanoma cell lines, seeking the molecular mechanisms. Lastly, it was evaluated the effects of 1-methyl-tryptopahn (1-MT), an IDO inhibitor, by its ability to inhibit IDO and also by its influency on the clonogenic capability. Bioinformatic study performed on GSE12391 showed that gene expression level of IDO was superior in the most advanced stages of the disease. Additionally, all sample of patient's primary melanoma presented IDO immunostaining, whereas, no nevus samples presented such staining. Besides, IDO occurrence was in the lymphoid infiltrates, in mononuclear cells from immune system. Two bioinformatic analysis of gene expression demonstrated that IDO was differentially overexpressed during BRAFi resistance stage. Moreover, protein expression results presented that MAPK pathway inhibition (both by BRAFi and by MEKy) was able to modulate IDO expression, and most of the cell lines presented an IDO downregulation. IDO activity, measured through kynurenine production, by HPLC was consonant with protein expression results, except by WM164 cell line, which did not present enzymatic activity, albeit the protein was present. By the end, 1-MT could inhibit efficiently IDO enzyme, blocking kynurenine production. Furthermore, 1-MT reduced clonogenic capability in a dose-dependent manner. Therefore, it was concluded that IDO expression increases along with melanoma progression, MAPK pathway inhibition regulated IDO expression and 1-MT reduced clonogenic capability, besides its primary function of IDO inhibitor.

**Keywords:** melanoma, resistance, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO).

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Progressão do melanoma: da pele normal ao melanoma metastático e genes/mutações envolvidos .....	20
<b>Figura 2.</b> As vias de sinalização MAPK e PI3K .....	21
<b>Figura 3.</b> Catabolismo do triptofano à quinurenina .....	23
<b>Figura 4.</b> Via de sinalização de IFN- $\gamma$ .....	26
<b>Figura 5.</b> Medicamentos disponíveis para o tratamento de melanoma .....	27
<b>Figura 6.</b> Diferenças morfológicas entre as linhagens parentais e resistentes da SK-MEL-28 .....	35
<b>Figura 7.</b> Expressão proteica da via MAPK .....	36
<b>Figura 8.</b> PCR para detecção de <i>Mycoplasma sp.</i> .....	38
<b>Figura 9.</b> Expressão gênica de IDO desde o nevo comum até à metástase de melanoma utilizando o banco público GSE12391 .....	43
<b>Figura 10.</b> Expressão gênica de IDO desde a pele normal até ao melanoma metastático utilizando o banco público GSE46517 .....	44
<b>Figura 11.</b> Diferença entre a imunomarcagem de IDO e marcação inespecífica de melanina/melanófagos .....	46
<b>Figura 12.</b> Expressão proteica de IDO na progressão do melanoma: do nevo à metástase .....	49
<b>Figura 13.</b> H&E das lâminas correspondentes à figura 12 - do nevo à metástase .....	51
<b>Figura 14.</b> Genes diferencialmente expressos entre linhagens parental e resistente ao vemurafenibe utilizando o banco de dados público GSE68840 ..	54
<b>Figura 15.</b> Genes diferencialmente expressos antes e após (durante resistência) tratamento com vemurafenibe utilizando o banco de dados público GSE65184 .....	55
<b>Figura 16.</b> Genes diferencialmente expressos entre linhagens parentais e resistentes ao vemurafenibe utilizando o banco de dados público GSE55583	56
<b>Figura 17.</b> Expressão proteica de IDO em diferentes concentrações do iBRAF .....	57

<b>Figura 18.</b> Expressão proteica da via JAK-STAT-IDO das linhagens parentais e resistentes da A375, WM164 e SK-MEL-28 e a respectiva quantificação proteica de IDO .....	58
<b>Figura 19.</b> Expressão proteica da via JAK-STAT-IDO das linhagens SK-MEL-173, SK-MEL-103 e SK-MEL-147 e a respectiva quantificação proteica de IDO. ....	61
<b>Figura 20.</b> Curva-padrão do triptofano e quinurenina em meio RPMI 5% e DMEM 10% .....	63
<b>Figura 21.</b> Concentração de quinurenina das linhagens SK-MEL-28, SK-MEL-19 e SK-MEL-29.....	64
<b>Figura 22.</b> Concentração de triptofano e quinurenina na linhagem parental e resistente da A375 .....	65
<b>Figura 23.</b> Concentração de triptofano e quinurenina na linhagem parental e resistente da SK-MEL-28. ....	66
<b>Figura 24.</b> Concentração de triptofano na linhagem parental e resistente da WM164.....	67
<b>Figura 25.</b> Concentração de triptofano e quinurenina nas linhagens SK-MEL-173, SK-MEL-103 e SK-MEL-147 .....	68
<b>Figura 26.</b> Concentração de quinurenina na linhagem parental e resistente da A375 após tratamento com 1-MT .....	71
<b>Figura 27.</b> Concentração de quinurenina na linhagem parental e resistente da SK-MEL-28 após tratamento com 1-MT .....	72
<b>Figura 28.</b> Potencial de inibição na formação de colônias do 1-MT na linhagem A375 parental e resistente .....	75
<b>Figura 29.</b> Potencial de inibição na formação de colônias do 1-MT na linhagem SK-MEL-28 parental e resistente .....	77
<b>Figura 30.</b> Viabilidade celular frente aos diferentes regimes de tratamento adotados .....	79
<b>Figura 31.</b> Viabilidade celular da linhagem A375 parental e resistente em diferentes concentrações do 1-MT .....	81
<b>Figura 32.</b> Viabilidade celular da linhagem SK-MEL-28 parental e resistente em diferentes concentrações do 1-MT .....	82

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Caracterização das linhagens de melanoma .....	35
<b>Tabela 2.</b> Viabilidade celular frente aos diferentes regimes de tratamento adotados das linhagens com e sem a mutação BRAFV600E .....	80
<b>Tabela 3.</b> Viabilidade celular da linhagem A375 parental e resistente em diferentes concentrações do 1-MT e em diferentes condições .....	81
<b>Tabela 4.</b> Viabilidade celular da linhagem SK-MEL-28 parental e resistente em diferentes concentrações do 1-MT e em diferentes condições .....	83

## LISTA DE APÊNDICES

**APÊNDICE A.** Script para análise de expressão gênica de IDO na progressão do melanoma através do gráfico tipo boxplot utilizando a linguagem de programação 'R' ..... 94

**APÊNDICE B.** Script para análise de genes diferencialmente expressos entre linhagens parental e resistente ao iBRAF através do gráfico tipo volcano plot utilizando a linguagem de programação 'R' ..... 96

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO A.</b> Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa .....	99
<b>ANEXO B.</b> Currículo Lattes.....	103
<b>ANEXO C.</b> Ficha do Aluno .....	107

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**1-MT:** 1-metil-triptofano

**AhR:** receptor de aril hidrocarboneto

**AKT:** proteína quinase específica para serina e treonina

**APCs:** células apresentadoras de antígenos

**BRAF:** isoforma B da proteína RAF

**CTLA-4:** antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium* - meio de cultura

**ERK:** proteína quinase regulada por sinal extracelular

**FDA:** *Food Drug Administration*

**GAS:** sequência ativada por interferon gama

**GCN2:** controle geral não-desreprimível 2

**GEO:** *Gene Expression Omnibus*

**H&E:** hematoxilina e eosina

**iBRAF:** inibidor de BRAF

**IDO:** indolamina 2, 3-dioxigenase

**IFNGR1:** receptor 1 do interferon gama

**IFNGR2:** receptor 2 do interferon gama

**IFN- $\alpha$ :** interferon alfa

**IFN- $\beta$ :** interferon beta

**IFN- $\gamma$ :** interferon gama

**IHQ:** imunohistoquímica

**IL-2:** interleucina 2

**IL-6:** interleucina 6

**IL-8:** interleucina 8

**IL-10:** interleucina 10

**IL-12:** interleucina 12

**iMEK:** inibidor de MEK

**INCA:** Instituto Nacional de Câncer

**JAK1:** janus quinase 1

**JAK2:** janus quinase 2

**MAPK:** proteínas quinases ativadas por mitógenos

**MEK:** proteína quinase ativadora da MAPK

**MHC:** complexo principal de histocompatibilidade  
**mTOR:** alvo da rapamicina em mamíferos  
**NCBI:** *National Center for Biotechnology Information*  
**PBS:** tampão fosfato salino  
**PD-1:** proteína de morte celular  
**PD-L1:** ligante 1 da proteína de morte celular  
**PD-L2:** ligante 2 da proteína de morte celular  
**PI3K:** fosfoinosítideo 3-quinase  
**PTEN:** fosfatase homóloga à tensina  
**QUIN:** quinurenina  
**RAF:** proteína quinase específica para serina e treonina  
**RAS:** subfamília das pequenas GTPases envolvida na sinalização intracelular  
**RPMI:** *Roswell Park Memorial Institute* - meio de cultura  
**RTK:** receptor de tirosina quinase  
**STAT1:** tradutor de sinal e ativador de transcrição 1  
**TDO:** triptofano-2,3- dioxigenase  
**TGF- $\beta$ :** fator de transformação do crescimento beta  
**TNF- $\alpha$ :** fator de necrose tumoral alfa  
**Tregs:** células T reguladoras ou regulatórias  
**TRP:** triptofano  
**UV:** ultravioleta  
**VEGF:** fator de crescimento vascular endotelial

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1.Melanoma .....	19
1.1.1.Vias de sinalização .....	19
1.2.Câncer e sistema imune.....	22
1.2.1.Enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO).....	23
1.2.2.Vias de sinalização de IDO .....	25
1.3.Tratamentos disponíveis para pacientes com melanoma .....	26
1.3.1.Terapia direcionada e resistência ao tratamento .....	27
1.3.2.Imunoterapia .....	29
1.3.3.Inibidores de IDO e 1-metil-triptofano (1-MT).....	29
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>31</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1.Análise de bioinformática.....	33
4.2. Imunohistoquímica.....	33
4.3.Cultura celular e manutenção .....	34
4.4.PCR para a detecção de <i>Mycoplasma sp</i> .....	37
4.5.Avaliação da expressão proteica por <i>Western Blotting</i> .....	38
4.6.Ensaio de atividade de IDO (quantificação de quinurenina) .....	39
4.7.Ensaio Clonogênico .....	40
4.8.Ensaio de viabilidade celular - MTT .....	40
4.9.Análise estatística .....	41
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>42</b>
<b>Capítulo I – IDO na progressão do melanoma</b> .....	<b>42</b>
5.1.Expressão gênica de IDO do nevo à metástase: um estudo <i>in silico</i> ....	42
5.2.Expressão proteica de IDO do nevo à metástase: imunohistoquímica ..	45

<b>Capítulo II – IDO na resistência ao iBRAF em melanoma</b> .....	53
5.3. Expressão gênica de IDO em melanoma – linhagens parentais e resistentes: um estudo <i>in silico</i> .....	53
5.4. Expressão proteica de IDO em melanoma – linhagens parentais e resistentes ao vemurafenibe .....	57
5.4.1. Linhagens com mutação BRAFV600E.....	57
5.4.2. Linhagens sem a mutação BRAFV600E .....	61
5.5. Ensaio de atividade de IDO: quantificação de quinurenina por HPLC... 63	
5.5.1. Curva padrão.....	63
5.5.2. Linhagens com a mutação BRAFV600E .....	64
5.5.3. Linhagens sem a mutação BRAFV600E .....	68
5.6. Ensaio de atividade de IDO: tratamento 1-MT .....	70
5.7. Ensaio clonogênico com 1-MT.....	73
5.8. Ensaio de viabilidade celular: MTT .....	79
5.8.1. Tratamento com IFN- $\gamma$ , iBRAF e iMEK.....	79
5.8.2. Tratamento com 1-MT.....	80
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	84
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	85
<b>APÊNDICES</b> .....	94
<b>ANEXOS</b> .....	99

## **1. Introdução**

### **1.1. Melanoma**

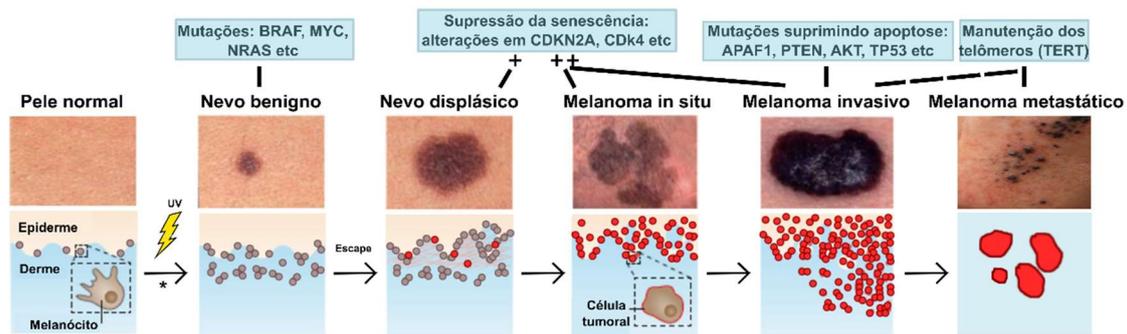
O câncer de pele configura-se como o mais frequente em todas as populações e no Brasil corresponde a cerca de 30% de todos os tumores malignos (INCA, 2018). Dentre os tipos de cânceres de pele, o melanoma é o menos frequente, representando menos de 5% de todos os tipos de câncer de pele. Entretanto, é o mais agressivo, sendo responsável por cerca de 95% das mortes relacionados ao câncer de pele (VAZQUEZ et al., 2015).

Além disso, a incidência da doença vem aumentando – tanto no Brasil e em outras regiões do mundo. De acordo com os dados do INCA, a estimativa de novos casos de melanoma no Brasil em 2016 chegou a 3.000 para homens e 2.670 para mulheres (INCA, 2016) e em 2018 chegou a 3.340 para homens e 2.920 para mulheres (INCA, 2018). Já dados epidemiológicos da população europeia e norte-americana indicam o contínuo aumento no número de pacientes diagnosticados com melanoma (MATTIA et al., 2018).

O melanoma desenvolve-se como resultado do acúmulo de mutações genéticas nos melanócitos, células responsáveis pela formação do pigmento da pele, a melanina. Estas células estão situadas na camada basal da epiderme, na interface entre a derme e a epiderme e são responsáveis pela proteção da pele contra os raios UV (SATYAMOORTHY e HERLYN, 2002).

Assim como em outros tipos de neoplasias, a progressão do melanoma pode seguir uma sequência de passos, os quais apresentamos a seguir, conforme a Figura 1. Em primeiro estágio, observa-se a proliferação de melanócitos que conduz a formação do nevo benigno, em seguida, esse aumento do número de células pode acarretar na formação do nevo displásico, com a sucessão dos crescimentos radial e vertical e posterior metástase (GRAY-SCHOPFER et al., 2007, SHAIN e BASTIAN, 2016). O termo ‘melanoma metastático’ é empregado para o estágio em que as células de melanoma se espalharam através dos nódulos linfáticos ou corrente sanguínea para órgãos diferentes de seu local de origem (ZBYTEK et al., 2008). Embora quase todos os órgãos possam estar envolvidos, os alvos mais frequentes são pulmões, fígado, ossos e cérebro (TAS, 2012).

**Figura 1.** Progressão do melanoma: da pele normal ao melanoma metastático e genes/mutações envolvidos



Fonte: adaptada de SHAIN e BASTIAN, 2016, por SEKIMOTO, 2017.

Legenda: estágios da progressão do melanoma, desde a pele normal ao melanoma metastático. Na parte superior, encontram-se as principais mutações envolvidas em cada estágio da doença.

O tempo de vida para os pacientes com melanoma metastático varia de 6 a 9 meses, e a taxa de sobrevivência por 5 anos varia de 5% a 19%, de acordo com a localização da metástase (MILLET et al., 2017). O principal fator para este prognóstico sombrio se deve à ausência de medicamentos efetivos no combate ao melanoma, isso deve ao desenvolvimento da resistência aos medicamentos disponíveis. Portanto, é necessário se investigar os complexos mecanismos de resistência com a finalidade de melhorar as terapias atuais e se desenvolver novas terapias (MERLINO et al., 2016).

### 1.1.1. Vias de sinalização

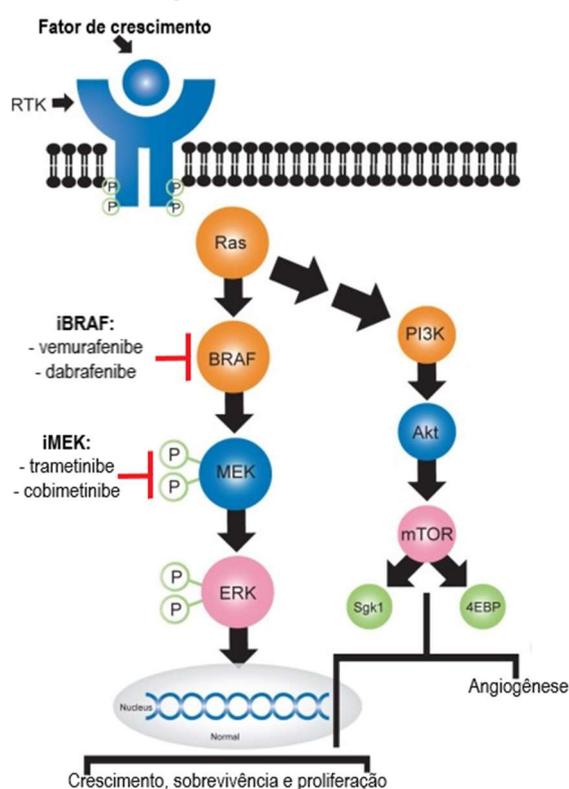
A via MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) é a melhor elucidada em relação à progressão do melanoma e outros tipos de câncer em decorrência da elevada taxa de mutações oncogênicas. Esta via está constitutivamente ativada em mais de 80% dos melanomas cutâneos, por isso, é o foco de muitas terapias direcionadas (YAJIMA et al., 2012). A esquematização da via pode ser vista na Figura 2.

Há uma mutação específica nos genes das quinases da proteína BRAF em cerca de 50% a 70% dos melanomas. Em mais de 90%, ocorre a troca de uma valina (V) no códon 600 por um ácido glutâmico (E) - mutação BRAFV600E. Outra mutação comum é a BRAFV600K (troca de valina por lisina), com frequência de 5-6%. (ASCIERTO et al., 2012). Estas mutações resultam na ativação constitutiva da proteína BRAF (MATTIA et al., 2018) e, por

consequência, leva ao aumento da atividade da via das MAPK (JANG e ATKINS, 2013).

A via de sinalização PI3K/PTEN/AKT/mTOR é a segunda via mais ativa em melanoma. Além disso, a atividade desta via está relacionada com a resistência aos inibidores de BRAF. As alterações genéticas que provocam mutações em PTEN, RAS, RTKs, p110, entre outras, conduzem a uma elevada taxa de AKT e mTOR ativados, fazendo desta via, um alvo terapêutico para novas drogas direcionadas. (YAJIMA et al., 2012 e MILLET et al., 2017).

**Figura 2.** As vias de sinalização MAPK e PI3K



Fonte: adaptado de KAKADIA et al., 2018, pelo autor, 2019.

Legenda: via de sinalização MAPK (esquerda) e PI3K (direita) – as duas principais vias no melanoma.

O conhecimento destas vias de sinalização, altamente ativadas em melanomas, permite realizar importantes intervenções terapêuticas. Os componentes dessas vias, sobretudo BRAF e MEK são alvos de inibidores alvo-dirigidos, uma vez que as mutações nessas proteínas são capazes de intensificar a sinalização da via de MAPK, uma das vias responsáveis pela proliferação celular e o escape da via apoptótica.

## 1.2. Câncer e sistema imune

A medida que as células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico, acredita-se que essas células adquiram uma sucessão de habilidades, como a capacidade de evitar a resposta imune. Assim, um processo de imunoeedição ocorre em 3 fases, quais sejam: 1) eliminação, reconhecida como a imunovigilância do câncer; 2) a fase de equilíbrio, que envolve a dormência do tumor e 3) o escape, com a progressão tumoral, onde o tumor pode detectar ou eliminar a resposta imune (DUNN, OLD e SCHREIBER, 2004; MITTAL et al., 2014).

Durante a o escape e consequente progressão tumoral, podemos destacar dois *checkpoints* imunológicos: o CTLA-4 (antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico) e a PD-1/PD-L1 (proteína de morte celular programada e seu respectivo ligante). O CTLA-4 é um receptor inibitório expresso nas células T, com uma função reguladora no sistema imune. Ao interagir com os ligantes CD80/CD86, ele transmite um sinal negativo para as células T, levando a inibição da expansão e ativação das células T. Enquanto que o CTLA-4 tem seu papel durante a fase de ativação inicial das células T, o PD-1 atua na fase efetora da ativação das células T. A interação com seus dois ligantes B7-H1 e B7-DC (PD-L1 e PD-L2) ocorre predominantemente nos tecidos periféricos, incluindo o microambiente tumoral, levando à apoptose e à regulação negativa das funções efetoras das células T. O aumento de expressão de PD-L1 em melanomas metastáticos foi encontrado junto a infiltrado de linfócitos e a produção de IFN- $\gamma$  (interferon gama), sugerindo um mecanismo de resistência do tumor contra o sistema imune. (OTT, HODI e ROBERT, 2013). Como ambos regulam negativamente os linfócitos T, eles passaram a ser alvo dos medicamentos imunoterápicos como será descrito no item 1.3.2 Imunoterapia.

É importante mencionar que o prêmio Nobel de medicina e fisiologia de 2018 foi para os pesquisadores Dr. James P. Allison e Dr. Tasuku Honjo justamente por estudarem estes dois *checkpoints* imunológicos, mostrando a revolução que as imunoterapias causaram no combate ao câncer (PRÊMIO NOBEL, 2018).

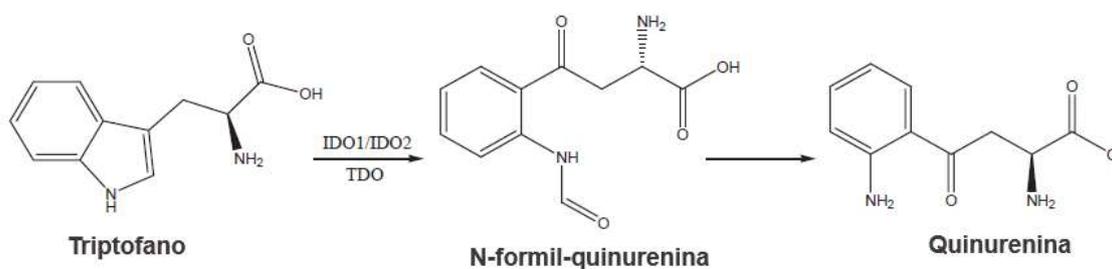
Além disso, a indução do catabolismo de aminoácidos é essencial para a progressão e regulação imunológica no câncer (CANTOR e SABATINI, 2012).

Um dos primeiros trabalhos que descrevem a da ligação entre o aumento do catabolismo de aminoácidos e câncer é o catabolismo de triptofano (TRP), sendo que há mais de sessenta anos os metabólitos do triptofano foram correlacionados ao câncer (BOYLAND e WILLIAMS, 1956). Depois disso, grupos de pesquisa buscaram por metabólitos de TRP em urina e soro de pacientes com diversos tipos de tumores. (LEPPANEN E OKA, 1963). Atualmente, o catabolismo do triptofano se tornou alvo de diversas linhas de pesquisa, desde de biomarcador para prognóstico da doença até para alvo de novos fármacos, principalmente, através da análise dos metabólitos produzidos e de enzimas chaves envolvidas no metabolismo do triptofano.

### 1.2.1. Enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO)

O triptofano (TRP) é metabolizado principalmente pela via das quinureninas (QUIN), na qual o TRP é oxidado a n-formil-quinurenina com posterior deformilação à QUIN. Participam desta conversão três enzimas: a triptofano-2,3- dioxigenase (TDO) e a indolamina 2, 3- dioxigenase 1 e 2 (IDO1 e IDO2).

**Figura 3.** Catabolismo do triptofano à quinurenina



Fonte: traduzido de MORENO et al., 2013.

Legenda: reação do triptofano à quinurenina, passando pelo intermediário N-formil-quinurenina. Esta reação pode ser realizada pelas enzimas IDO1, IDO2 e TDO.

Ambas isoformas de IDO convertem TRP em QUIN, porém, com velocidades diferentes. A IDO2 apresenta um padrão de expressão mais restrita a alguns tipos celulares e tecidos com uma atividade enzimática de apenas 3-5% da atividade da IDO1. A similaridade entre as duas isoformas é de 43%. Além disso, IDO2 é menos responsiva a citocinas inflamatórias, como o IFN- $\gamma$  e seu papel fisiopatológico ainda não está completamente elucidado. (BALL et al.,

2007). No decorrer do texto, o termo 'IDO' se refere a IDO1, salvo se especificada de outra maneira.

A enzima IDO é induzível e está presente em diversos tipos celulares, incluindo células do sistema imune e células tumorais (DE JONG et al., 2009). Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que a IDO tem um papel chave na regulação da evasão do sistema imune pelos tumores. O seu mecanismo de ação está associado com a redução intratumoral de infiltrado de células T efetoras, através do consumo de triptofano e através do seu metabólito bioativo, a quinurenina (LEE et al., 2002 e SHARMA et al., 2009). De acordo com a revisão de MUNN e MELLOR (2016), reconhece-se que:

- A depleção de triptofano pelo aumento atividade de IDO pode ativar a enzima quinase GCN2 em células T, assim inibindo a proliferação de células T e promovendo a diferenciação de células T CD4+ em células T regulatórias (Tregs).
- A quinurenina e demais metabólitos da via se ligam e ativam o receptor de xenobióticos aril hidrocarboneto (AhR), e promovem a diferenciação de células Tregs e aquisição de um fenótipo imunossupressivo de células dendríticas e macrófagos. A imunossupressão de células dendríticas promove a secreção de citocinas inibitórias, como a IL-10 e TGF- $\beta$  em vez de citocinas inflamatórias, como a IL-12.

Assim, o impacto do consumo e depleção de triptofano pela via das quinureninas, a partir da indução de IDO em tumores, faz parte dos principais mecanismos de tolerância, imunoescape e progressão tumoral. (KIM, EMI e TANABE, 2007; MUNN e MELLOR, 2007; SWANN e SMYTH, 2007).

Nos casos de melanomas, a IDO é comumente encontrada em melanoma primário e em células do endotélio peritumoral, no linfonodo sentinela, e em metástases nodais. Esse padrão de expressão de IDO no melanoma está relacionado a progressão e invasão tumoral (LEE et al., 2003, SPEECKAERT et al., 2012 e CHEVOLET et al., 2014). Além disso, esta enzima contribui também para a imunossupressão encontrada no melanoma (HOLMGAARD et al., 2013; UYTENHOVE et al., 2003).

O aumento da expressão e atividade de IDO e subsequente aumento da razão QUIN/TRP plasmáticos em muitos tipos de cânceres tem sido associada a um prognóstico ruim e a metástases, como por exemplo em melanomas e

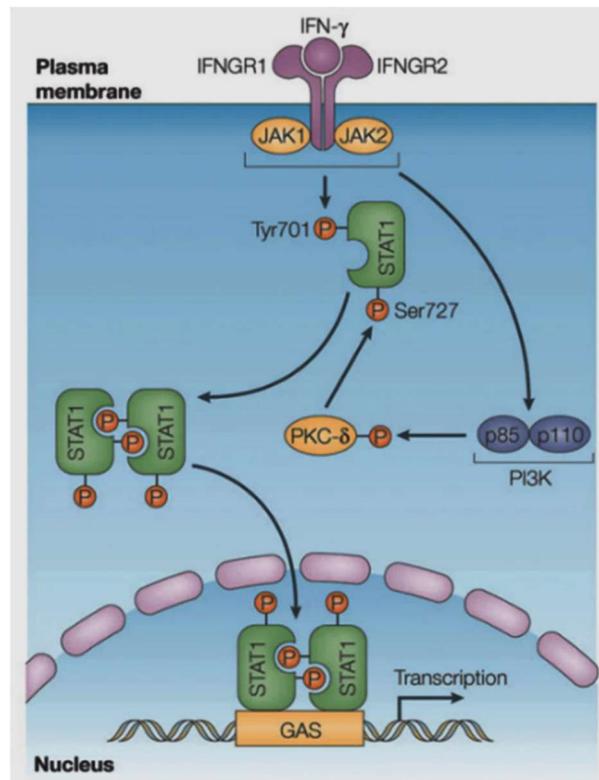
câncer cervical. (WEINLICH et al., 2006, INO et al., 2008; SPEECKAERT et al., 2012, HASCITHA et al., 2016). Em alguns pacientes, a quinurenina plasmática volta ao normal após o tratamento com inibidores de IDO, o que sugere que a quinurenina poderia ser um bom marcador prognóstico. (MUNN e MELLOR, 2016).

Além disso, BALACHANDRAN e colaboradores (2011) mostraram que o mesilato de imatinibe, um medicamento antineoplásico, ativa células T CD8+ e induz a apoptose de células Tregs no tumor, através do aumento das respostas de células T efectoras e da inibição de IDO. Assim, os inibidores de IDO têm sido sugeridos como coadjuvantes na terapia tumoral (HOLMGAARD et al, 2013. e MUNN e MELLOR, 2016).

### **1.2.2. Vias de sinalização de IDO**

A enzima IDO é induzível e entre os principais indutores, estão os interferons. Interferons tipo 1 (IFN- $\alpha$  e  $\beta$ ) e tipo II (IFN- $\gamma$ ) são marcadores clássicos da inflamação, sendo potentes indutores da resposta regulatória mediada pela IDO (MUNN e MELLOR, 2016). O IFN- $\gamma$  é o principal indutor de IDO (Yasui et al., 1986) e pode ser produzido por diferentes células imunológicas no microambiente tumoral sendo considerada uma citocina essencial para os mecanismos de escape. (GAJEWSKI, SCHREIBER e FU, 2013).

O IFN- $\gamma$  se liga no receptor de IFN- $\gamma$ , o qual é composto de 2 subunidades, IFNGR1 e IFNGR2, os quais estão associados a JAK1 e JAK2, respectivamente. A oligomerização das subunidades do receptor ativa as proteínas JAK1 e JAK2 através da trans-fosforilação entre as proteínas JAKs. Então, STAT1 é recrutado junto ao receptor, onde é fosforilado na tirosina, permitindo a formação do homodímero que irá se translocar para o núcleo, se ligando ao elemento GAS nas regiões promotoras para iniciar a transcrição de diversos genes, incluindo a IDO.

**Figura 4.** Via de sinalização de IFN- $\gamma$ 

Fonte: PLATANIAS, 2005.

Legenda: o IFN- $\gamma$  se liga aos receptores IFNGR1 e IFNGR2, ocorrendo a trans-fosforilação entre JAK1 e JAK2. STAT1 é recrutada junto ao receptor e fosforilada, permitindo a formação do homodímero que irá se translocar para o núcleo se ligando a regiões promotoras levando a transcrição de IDO.

### 1.3. Tratamentos disponíveis para pacientes com melanoma

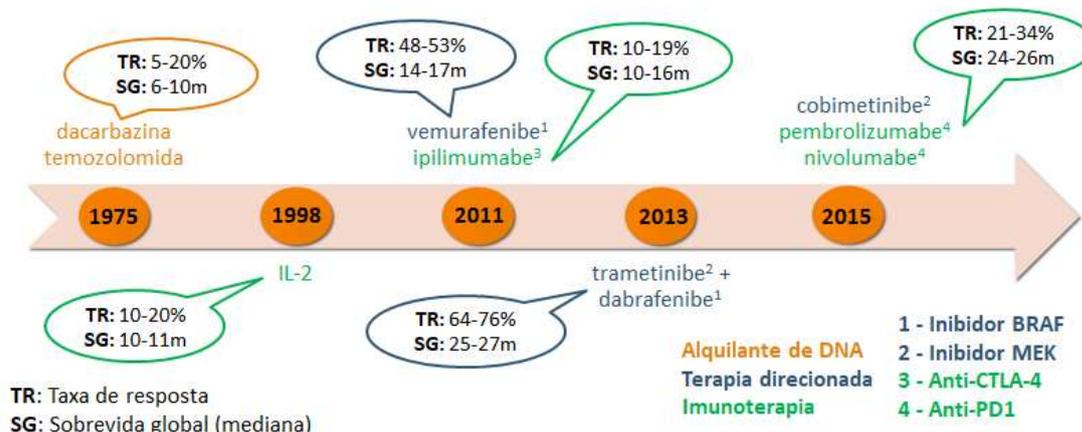
O tratamento para melanomas em estágios avançados sempre teve resultados desanimadores. Se o tumor é detectado precocemente, a excisão cirúrgica promove a cura em aproximadamente 99% dos pacientes. (SLIPICEVIC e HERLYN, 2012). No entanto, em estágios mais avançados quando a cirurgia deixa de ser uma opção terapêutica, os pacientes devem ser tratados com terapia sistêmica. A principal dificuldade no tratamento do melanoma metastático é a baixa taxa de resposta a terapias convencionais (quimioterapias) e também devido à grande possibilidade de apresentar resistência à terapia direcionada (MERLINO et al., 2016).

Os protocolos clínicos até recentemente utilizados apresentavam caráter meramente paliativo. A dacarbazina e a interleucina-2 (IL-2) são drogas que foram aprovadas para serem utilizadas pelos pacientes que se encontravam no

estágio IV do melanoma (estágio metastático), porém, apresentam taxa de resposta em menos de 15% dos pacientes. (MERLINO et al., 2016).

A figura 5 mostra a evolução dos medicamentos utilizados no combate ao melanoma, partindo da dacarbazina em 1975 às imunoterapias atuais.

**Figura 5.** Medicamentos disponíveis para o tratamento de melanoma



Fonte: autoria própria.

Legenda: as datas na linha do tempo correspondem ao ano de aprovação pelo FDA. Os medicamentos em laranja correspondem à classe de alquilantes de DNA; em azul à terapia direcionada e em verde à imunoterapia.

### 1.3.1. Terapia direcionada e resistência ao tratamento

Em 2011, foi aprovado pelo *Food Drug Administration* (FDA) um novo fármaco, o vemurafenibe, uma pequena molécula específica inibidora da mutação BRAFV600E. Trata-se de uma nova classe de medicamento conhecida como terapia direcionada ou terapia alvo-dirigida.

O vemurafenibe foi o primeiro medicamento que demonstrou um aumento na sobrevida global e também na sobrevida livre de progressão em melanoma metastático contendo a mutação BRAFV600E. Após um estudo de acompanhamento, a mediana da sobrevida global para os pacientes tratados com vemurafenibe foi de 13,6 meses comparados com 9,7 meses com os pacientes tratados com a dacarbazina. (CHAPMAN et al., 2017).

Além disso, estudos demonstraram que o vemurafenibe apresenta uma atuação mais abrangente, pois além de inibir a mutação em BRAF, o vemurafenibe promoveu um aumento em antígenos associados ao melanoma, bem como um aumento da reatividade antigênica específica das células T.

(FREDERICK et al., 2013). Estes achados foram corroborados por estudos que demonstraram que pacientes com melanoma tratados com inibidor de BRAF (iBRAF) exibiram não só um aumento nos antígenos associados ao melanoma como um aumento expressão de MHC de classe I e II (KHALILI et al., 2013), diminuição do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (SAPKOTA, HILL e POLLACK, 2013) e diminuição sistêmica de interleucinas pró-tumorais de IL-8 e IL-6, além de aumento da CCL4, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (COOPER et al, 2013; SAPKOTA, HILL e POLLACK, 2013; WHIPPLE e BRINCKERHOFF, 2014; WILMOTT et al, 2014). Além disso, tem se demonstrado que o tratamento com vemurafenibe promoveu um aumento da infiltração de linfócitos sem alterar a viabilidade dos mesmos (WILMOTT et al., 2012).

Contudo, outros efeitos imunológicos podem estar presentes e são importantes para a compreensão da melhor eficiência de resposta ao vemurafenibe e se existem mecanismos específicos subjacentes ao processo de resistência ao mesmo.

Nos últimos anos observou-se um notável avanço que a terapia direcionada proporcionou aos pacientes. Entretanto, um dos principais desafios é a resistência adquirida na maioria dos pacientes tratados com inibidores de BRAF, incluindo o vemurafenibe. O desenvolvimento da resistência é observado após cerca de 6 meses após monoterapia com iBRAF e após 9 a 10 meses após terapia combinatória com iBRAF e de inibidor de MEK (iMEK). (GOLDINGER et al., 2013).

A reativação da via de sinalização MAPK é o principal mecanismo na resistência adquirida. Nesse sentido, foi observado pelo nosso grupo de pesquisa que células resistentes ao vemurafenibe apresentavam reativação da sinalização da via MAPK e também um aumento da atividade de metaloproteinases, como a MMP-2 e, conseqüentemente havia uma maior capacidade de invasão em comparação às células parentais (SANDRI, 2016). Outro mecanismo é a suprarregulação da via PI3K-AKT-mTOR. (ZHANG, 2015).

Outra possível explicação seria a heterogeneidade do tumor, em que uma pequena parcela de células tumorais é resistente à intervenção terapêutica. E por seleção empregada pelos medicamentos, as células sobreviventes (e resistentes ao tratamento) se proliferam, culminando assim, com a aquisição completa da resistência. (KUDCHADKAR et al., 2013). Por isso, é essencial

buscarmos a compreensão de outros mecanismos de grande importância clínica, associados à resistência adquirida à terapêutica com tais inibidores.

### **1.3.2. Imunoterapia**

Em 2011, também foi aprovado pelo *Food Drug Administration* (FDA) o uso do ipilimumabe, um anticorpo monoclonal que atua contra o antígeno-4 presente nos linfócitos T citotóxicos (CTLA-4). O bloqueio de CTLA-4 aumenta a ativação e proliferação de células T efetoras no infiltrado tumoral. A taxa de sobrevida global foi de 10,0 meses comparado com 6,4 meses do grupo controle. Além disso, apresentou uma alta taxa de sobrevida a longo prazo: após 3 anos, 20% a 26% dos pacientes ainda estavam vivos. (FONG e SMALL, 2008; HODI et al., 2010; SCHADENDORF et al., 2015)

Em 2015, pembrolizumabe e nivolumabe, bloqueadores de PD-1, proteína responsável pela morte programada do linfócito T foram aprovados pelo FDA para tratamento de melanomas em estágio avançados. Estudos recentes têm demonstrado uma boa resposta nos tumores com poucos efeitos colaterais (TOPALIAN et al., 2012; OTT, HODI e ROBERT, 2013). A monoterapia de nivolumabe apresentou uma sobrevida livre de progressão de 6,9 meses – enquanto que a monoterapia de ipilimumabe apresentou uma sobrevida de apenas 2,9 meses. Entretanto, ao se combinar ambas imunoterapias, a sobrevida livre de progressão alcançou 11,5 meses, com taxa de resposta objetiva de 40%.

Portanto, é notável que as imunoterapias revolucionaram o tratamento do melanoma, principalmente na sobrevida (tanto global, quanto livre de progressão) dos pacientes. Entretanto, a taxa de resposta continua muito baixa, por isso, ainda se faz necessário a busca de novos alvos farmacológicos.

### **1.3.3. Inibidores de IDO e 1-metil-triptofano (1-MT)**

A inibição da enzima IDO tem sido considerada uma estratégia excelente para a restauração da imunidade. Estudos clínicos têm investigado regimes terapêuticos que incluem o uso da imunoterapia associada a inibidores de IDO. Os resultados encontrados se apresentam promissores no tratamento de

tumores, como câncer de mama, glioblastoma, pâncreas, pulmão, ovário e inclusive do melanoma. (MULLER e SCHERLE, 2006; MUNN e MELLOR, 2016).

Atualmente, dois inibidores de IDO tem sido usados nos estudos clínicos em andamento: o indoximod (1-metil-D-triptofano, ou 1-D-MT) e o epacadostat. A estratégia é usar terapia combinada incluindo inibidores de IDO com o intuito de aumentar, a resposta imune induzida por quimioterapia, vacina ou inibidores de *checkpoints* imunológicos. Mecanicamente, drogas inibidoras da IDO não agem diretamente contra o tumor (MUNN e MELLOR, 2016).

No primeiro semestre de 2018, foram divulgados resultados do estudo clínico de fase 3 onde pacientes com melanoma foram tratados com um inibidor de IDO, o epacadostat juntamente com o pembrolizumabe. Entretanto, os resultados não mostraram superioridade no grupo que recebeu a combinação (epacadostat e pembrolizumabe), comparado ao grupo que recebeu apenas pembrolizumabe (KOMIYA e HUANG, 2018).

Embora, o inibidor de IDO tenha falhado nos testes clínicos de fase três, ele ainda apresenta potencial, pois de acordo com o Dr. Drew Pardoll, diretor do Johns Hopkins Bloomberg-Kimmel Institute for Cancer Immunotherapy (FIDLER, 2018), um dos problemas do estudo foi não medir/acompanhar a IDO e a quinurenina nos pacientes. Uma abordagem mais direcionada, seria indicar os inibidores de IDO somente para os pacientes que expressam a IDO – desta maneira, o medicamento seria, provavelmente, mais eficaz. Além disso, de acordo com o neuroimunologista Dr. Michael Platten da Universidade de Heidelberg, Alemanha, os estudos avançaram de maneira muito rápida para os estudos clínicos e agora, percebemos que a IDO é ainda uma caixa preta e que há muito a ser pesquisado (GARBER, 2018).

Além das informações da terapia combinada, sabe-se a taxa de resposta a monoterapia com pembrolizumabe é de 33% e a sua associação com indoximod elevou esta taxa a 56%. Apesar de ser um resultado de um estudo clínico de fase 2, o indoximod demonstra potencial para seguir para a fase 3 de pesquisa clínica (ZAKHARIA, 2018).

Em relação ao 1-MT, estudos demonstraram que a forma levógiara (-L) ser um inibidor mais potente de IDO em ensaios celulares (LÖB et al., 2009). Entretanto, sua forma dextrógiara (-D) possui maior atividade antitumoral em modelos animais, sendo mais eficaz em reverter a supressão de linfócitos T

mediada por células dendríticas IDO positivas, e, portanto, tem sido a isoforma selecionada para estudos clínicos em humanos (HOU et al., 2007). Diante deste cenário, ainda são necessárias pesquisas a respeito da IDO e seus inibidores para que futuros estudos clínicos possam ser bem-sucedidos.

## **2. Justificativa**

O melanoma possui uma alta agressividade e corresponde a 80% das mortes dentre os cânceres de pele. Os inibidores de BRAF (iBRAFs) e de MEK (iMEK), inauguraram uma nova classe de medicamentos, a terapia direcionada, no combate ao melanoma metastático. Entretanto, os pacientes adquirem resistência ao tratamento em poucos meses. Diante deste cenário, é necessário buscar-se entender os mecanismos subjacentes a resistência ao tratamento, além daqueles já descritos na literatura. Dentre estes mecanismos, é essencial compreender o envolvimento da enzima IDO, uma enzima responsável pelo consumo e depleção do triptofano, e consequente produção de quinurenina, importantes fatores na indução da imunotolerância, imunoescape e progressão tumoral.

Portanto, se faz relevante novos estudos para entender o comportamento da IDO nas diferentes fases do melanoma, incluindo a progressão da doença até a fase de resistência à terapia direcionada. A partir do conhecimento gerado destes estudos, é possível buscar novas soluções aos pacientes a partir de novas terapias, incluindo terapias combinatórias, tendo a IDO como possível alvo farmacológico.

### 3. Objetivos

#### Geral

Este trabalho objetivou avaliar a expressão de IDO durante a progressão do melanoma humano, do nevo até o melanoma metastático e avaliar a regulação de IDO após bloqueio da via MAPK em linhagens parentais e resistentes ao iBRAF.

#### Específicos

- Avaliar a expressão gênica de IDO em repositórios públicos durante a progressão do melanoma, utilizando a linguagem de programação 'R';
- Analisar a expressão proteica de IDO em amostras de pacientes em diferentes estágios da doença através da imunohistoquímica;
- Avaliar a expressão gênica de IDO em repositórios públicos comparando a fase responsiva e a fase de resistência ao iBRAF, utilizando a linguagem de programação 'R';
- Analisar a expressão proteica de IDO induzido por IFN- $\gamma$  após inibição da via MAPK em linhagens parentais e resistentes ao iBRAF e também em linhagens BRAF selvagem;
- Avaliar a atividade enzimática de IDO induzido por IFN- $\gamma$  após inibição da via MAPK em linhagens parentais e resistentes ao iBRAF e também em linhagens BRAF selvagem;
- Investigar a capacidade do 1-MT de inibir a IDO e também sua influência na capacidade clonogênica de linhagens parentais e resistentes ao iBRAF.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Análise de bioinformática

Foi realizada a análise de bioinformática para avaliar a expressão gênica da enzima IDO durante a progressão do melanoma - desde a pele normal até ao melanoma metastático. Foram utilizados 2 bancos de dados públicos localizados no repositório *Gene Expression Omnibus (GEO)* do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. Os repositórios utilizados foram o GSE12391 e o GSE46517. A linguagem de programação utilizada foi o 'R' e o *script* utilizado se encontra no Apêndice A como referência.

Em seguida, foi realizada uma nova análise de bioinformática para avaliar a expressão de IDO e de toda a via JAK-STAT (IFNGR1, IFNGR2, JAK1, JAK2 e STAT1) em linhagens parentais e resistentes ao inibidor de BRAF. Os repositórios utilizados foram GSE55583, GSE68840 e GSE65184. Os genes com  $\log_2FC$  (*fold-change*) maior que 1,5 e valor de P ajustado menor que 0,05 foram considerados diferencialmente expressos. A linguagem de programação utilizada foi o 'R' e o *script* utilizado se encontra no Apêndice B como referência.

### 4.2. Imunohistoquímica

As amostras de melanoma em diferentes estágios (do nevo até a metástase) foram uma colaboração junto com a Profa. Dra. Márcia Edilaine Lopes Consolaro, da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da respectiva universidade. O parecer consubstanciado (número 2.759.738) se encontra no anexo A.

As lâminas foram desparafinizadas *overnight* a 60 °C. A hidratação ocorreu na seguinte sequência: xilol (duas vezes por 15 minutos cada), etanol 100%, 90%, 70%, 50% e água destilado (1 minuto cada). A imuno-histoquímica foi realizada com o kit da EnVision™ FLEX da Dako (K8000, Glostrup, Dinamarca). Após desparafinização e hidratação, a recuperação antigênica foi realizado com o *Target Retrieval Solution High pH* em microondas, por 5 minutos. As lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente por 20-30 minutos, lavadas com solução de lavagem (*Wash Buffer*). Foi realizado o bloqueio da

peroxidase com o *Peroxidase-Blocking Reagent* por 10 minutos e depois lavadas com o *Wash Buffer*.

Em seguida, foi realizado bloqueio com albumina de soro bovino (BSA) 2% por 30 minutos a 37 °C, em câmara úmida semi-aberta. O anticorpo primário anti-IDO (*Cell Signaling*, #86630, MA, EUA) foi diluído 1:150 em BSA 2% e incubado por 1 hora a 37 °C, em câmara úmida fechada e depois foi realizada a lavagem com o *Wash Buffer*. Então, foi incubado com a solução *Flex/HRP* por mais 1 hora a 37 °C, em câmara úmida semi-aberta e depois foi realizada a lavagem com o *Wash Buffer*.

Para a revelação, foi utilizada 1 gota de *FLEX DAB + Chormogen* em 1 mL do *Substrate buffer*. Essa solução foi removida até o aparecimento da cor marrom nas lâminas. Foi adicionado hematoxilina de Harris por cerca de 45 segundos e feito a lavagem. Por fim, foi realizada a desidratação na seguinte sequência: água destilada, etanol 50%, 70%, 90%, 100% (duas vezes) (1 minuto cada) e xilol (duas vezes por 15 minutos cada) e a montagem da lâmina.

A leitura e as fotografias foram feitas em microscópio ótico *Nikon Optiphot microscope* (Shinagawa, Tóquio, Japão), e o software utilizado foi o *NIS-Elements*.

A avaliação e análise das lâminas foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Aloísio Souza Felipe da Silva, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP e Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da USP.

### **4.3. Cultura celular e manutenção**

Para os ensaios em monocamada foram utilizadas linhagens de melanoma humano com mutações BRAFV600E: SK-MEL-28, WM164 e A375 parentais e resistentes ao vemurafenibe e com mutações NRAS: SK-MEL-103, SK-MEL-147 e SK-MEL-173. A tabela 1 resume as linhagens utilizadas e suas mutações.

**Tabela 1.** Caracterização das linhagens de melanoma

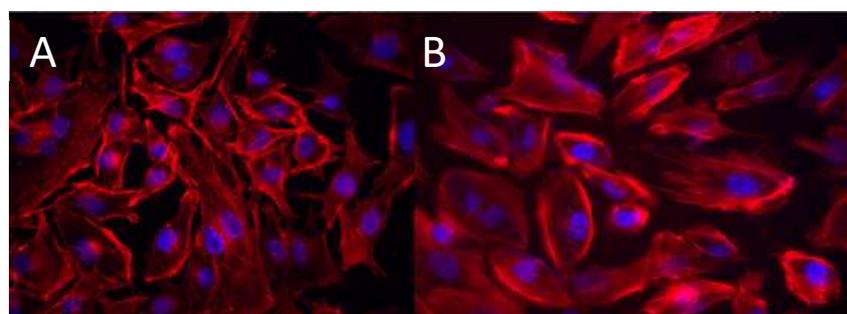
Linhagem	Tipo	Mutação em BRAF	Mutação em NRAS
SK-MEL-28	metastático	V600E	-
WM164	metastático	V600E	-
A375	metastático	V600E	-
SK-MEL-103	metastático	-	Q61R
SK-MEL-147	metastático	-	Q61R
SK-MEL-173	metastático	-	Q61K

Fonte: autoria própria

Legenda: As linhagens de melanoma foram caracterizadas quanto ao tipo e a mutações em BRAF e NRAS.

Para a geração das linhagens resistentes ao iBRAF, as células SK-MEL-28, WM164 e A375 parentais foram plaqueadas em baixa densidade e tratadas a cada três dias com baixas concentrações do iBRAF, com aumento gradativo da concentração, partindo de 0,5  $\mu\text{M}$  até o máximo de 3,0  $\mu\text{M}$  (SANDRI et al., 2016). As culturas celulares foram observadas diariamente, durante o período de aproximadamente 6 semanas para o acompanhamento da formação de colônias resistentes (Nazarian et al., 2010). As colônias formadas foram transferidas para uma nova placa para o crescimento e propagação da população celular resistente na presença do iBRAF (Figura 6).

**Figura 6.** Diferenças morfológicas entre as linhagens parentais e resistentes da SK-MEL-28



Fonte: ALVES-FERNANDES et al., 2018.

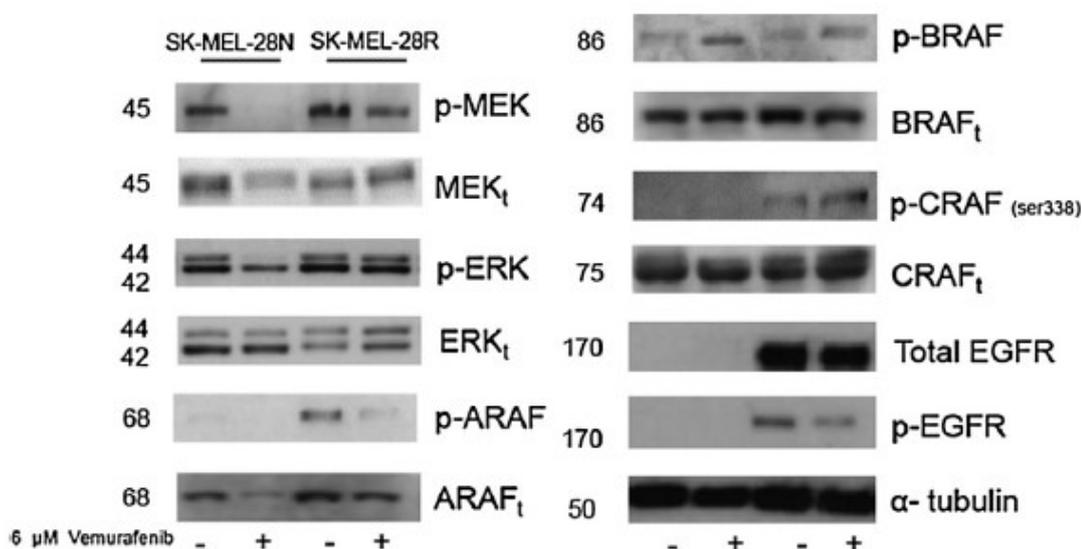
Legenda: fotomicrografias mostrando as diferenças morfológicas entre as linhagens SK-MEL-28 parentais (A) e resistentes (B) ao iBRAF. Em azul: coloração DAPI, corando o núcleo das células. Em vermelho: faloidina conjugada com fluoresceína, corando os filamentos de actina.

A aquisição de resistência foi confirmada pela análise de proteínas da via de MAPK e de outras vias importantes para a progressão do melanoma. O tratamento agudo com iBRAF por 72 h significativamente diminuiu a fosforilação de MEK e ERK nas células SK-MEL-28 parentais, enquanto as células resistentes mostraram reativação da via de MAPK após a aquisição da resistência (figura 7).

Todos esses experimentos, em conjunto, nos permitem afirmar que as células geradas são resistentes ao iBRAF e que podem ser usadas em estudos futuros como modelo para o estudo da resistência em melanomas.

As linhagens parentais serão denominadas P e as resistentes serão denominadas R. Além disso, o termo 'linhagem resistente' remete a resistência adquirida ao inibidor de BRAF.

**Figura 7.** Expressão proteica da via MAPK



Fonte: SANDRI et al., 2016.

Legenda: proteínas totais foram extraídas para análise de expressão proteica de p-MEK, MEK<sub>t</sub>, p-ERK, ERK<sub>t</sub>, p-ARAF, ARAF<sub>t</sub>, p-BRAF, BRAF<sub>t</sub>, p-CRAF, CRAF and EGFR nas linhagens SK-MEL-28 parentais e resistentes. O nível de proteína foi avaliado após 72 h na presença (+) ou ausência (-) de iBRAF. A proteína endógena utilizada foi α-tubulina.

As células foram cultivadas a 37°C em placas de cultura contendo meio de crescimento específico (DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino para as linhagens SK-MEL-28, SK-MEL-103, SK-MEL-147 e SK-MEL-173; e RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino para as linhagens A375 e WM164) juntamente com antibióticos (100 u/mL de penicilina e 100 μg/mL de

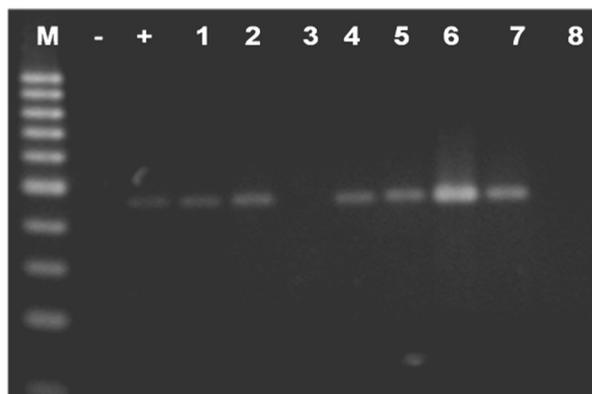
estreptomicina), em estufa de cultura celular em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, para manutenção de pH próximo ao fisiológico. Após atingirem 70-80% de confluência, as células foram lavadas com solução de PBS A 1X (tampão fosfato salino livre de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>) e, posteriormente, com auxílio de tripsina 0,1% (PBS A contendo 1 mM EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético) foram subcultivadas. Os estoques celulares são mantidos em soro fetal bovino contendo 10% DMSO (dimetilsulfóxido) a -196°C, em reservatório com nitrogênio líquido.

As linhagens foram tratadas com 50 ng/mL IFN- $\gamma$  (Invitrogen, CA, EUA) para que a produção deIDO seja estimulada na presença e na ausência do vemurafenibe (3,0  $\mu$ M) (Selleck Chemicals – Houston, TX, USA) durante 24 horas. O ensaio de MTT foi utilizado para determinação da viabilidade celular.

#### **4.4. PCR para a detecção de *Mycoplasma sp.***

Este ensaio tem por objetivo monitorar a contaminação por *Mycoplasma sp* nas células em cultura como parte do controle de qualidade de pesquisa no laboratório. Foi 1,0 mL coletado o sobrenadante da cultura celular, que foi metabolizado por pelo menos 48 h. Este foi centrifugado, e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuscitado em solução LOTE (Low Tris-EDTA – concentração 3 mM de Tris-HCl e 0,2 mM de EDTA) e então incubado por 5 minutos a 95 °C. A detecção do DNA de *Mycoplasma sp* nas amostras foi realizada por meio do PCR convencional utilizando 10  $\mu$ L de amostra mais 20  $\mu$ L de *mix* (9,7  $\mu$ L de água deionizada autoclavada, 4,5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 3  $\mu$ L PCR *buffer* 10x, 1  $\mu$ L de primer oligo sense (5' GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG 3'), 1  $\mu$ L de primer oligo anti-sense (5' CGG ATA ACG GTT GCG ACC TAT 3'), 0,6  $\mu$ L de dNTP e 0,2  $\mu$ L de Taq polimerase 5 U/ $\mu$ L). O ciclo utilizado foi de 7 minutos a 94 °C (uma vez), 1 minuto a 94 °C + 1 minuto a 60 °C + 1,5 minuto a 72 °C (30 vezes) e 10 minutos a 72 °C (uma vez). As amostras amplificadas foram submetidas à corrida de eletroforese (100 V, 300 mA, 35 minutos), usando gel de agarose 2%. Após a corrida o gel foi incubado com solução de 0,01% de *GelRed*<sup>®</sup> (Biotium, EUA) em água deionizada. Para a detecção das bandas foi utilizado o transluminador. As bandas de 400 a 500 bp que estiverem fluorescentes são consideradas positivas para contaminação por *Mycoplasma sp*.

**Figura 8.** PCR para detecção de *Mycoplasma sp.*



Fonte: dissertação de SANTOS, S. C. C. (2018).

Legenda: imagem da eletroforese em gel de agarose gerada por transluminador UV. Colunas (M): marcador de pares de base, (-) controle negativo, (+) controle positivo, (1 a 8) amostras coletadas da cultura de células. As bandas fluorescentes (400 – 500 bp) indicam a presença de *Mycoplasma sp.*

As placas cujo resultado fora positivo para a presença de *Mycoplasma sp* foram descartadas ou tratadas com Plasmocin™ (InvivoGen, EUA), na concentração de 25 µg/ml por 1 a 2 semanas. O tratamento ocorria a cada 3 a 4 dias. Após o tratamento e a confirmação da eliminação de *Mycoplasma sp.*, as células ficavam uma semana sem o tratamento e somente após esse período, elas foram utilizadas para os experimentos.

#### **4.5. Avaliação da expressão proteica por *Western Blotting***

As células foram plaqueadas com o objetivo de se atingir 80% de confluência em 18 horas. Após 18 horas, o meio foi trocado e foram adicionados os tratamentos IFN-γ (50 ng/mL) e/ou vemurafenibe (3,0 µM). Após 24 horas de tratamento é realizada a extração proteica.

Os lisados celulares para *Western Blotting* foram preparados em tampão RIPA com coquetel de inibidores de protease (Roche, Penzberg, Upper Bavaria, Alemanha) e com coquetel de inibidores de fosfatases I e II II (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Depois, 40g de proteína total foi submetida a eletroforese em gel SDS com 8% a 12% de gradiente em condições redutoras e subsequentemente transferida para membrana PVDF (Hybond-P, AmershamPharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). A membrana foi bloqueada com BSA 5% diluído TBS-Tween 20 (50 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM de NaCl, 0.1% Tween-20) por 1 hora e então foram testados com os

seguintes anticorpos/diluição: IDO (Cell Signaling, #86630, 1:1000), STAT1 (Cell Signaling, #9172, 1:1000), pSTAT1 (Cell Signaling, #9167, 1:1000), JAK2 (Cell Signaling, #D2E12, 1:1000), pJAK2 (Cell Signaling, #3771, 1:1000). As bandas de proteínas foram detectadas por um sistema de quimioluminescência aumentada (ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA).

#### **4.6. Ensaio de atividade de IDO (quantificação de quinurenina)**

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços com o objetivo de se atingir 80% de confluência em 18 horas. Após 18 horas, o meio foi trocado e os seguintes tratamentos foram utilizados: IFN- $\gamma$  (50 ng/mL), vemurafenibe (3,0  $\mu$ M) e um inibidor de IDO, o 1-metil-DL-tripfano (1-DL-MT) (Sigma-Aldrich, MO, EUA), em diferentes concentrações: 0,5, 1,0 e 1,5 mM. Após 24 horas de tratamento é realizada a extração proteica.

Neste trabalho, o termo '1-MT' será referido à mistura racêmica 1-DL-MT, salvo se especificada de outra maneira.

A atividade da IDO foi medida por meio da produção de quinurenina, através do sobrenadante da cultura celular, conforme descrito por Moreno e colaboradores (2013) e Tourino e colaboradores (2013). Foram coletados 150  $\mu$ L do sobrenadante da cultura celular e depois foram adicionados 1500  $\mu$ L em acetona gelada – as amostras foram agitadas e depois mantidas em freezer (-20 °C) por 1 hora. Após esse período, foram centrifugadas por 14000 rpm a 4 °C por 10 minutos.

O *pellet* foi descartado e o sobrenadante (a camada orgânica) foi transferido para um tubo de vidro, protegido da luz. Então, a amostra foi evaporada em temperatura ambiente sob um fluxo de nitrogênio. O resíduo foi dissolvido em 150 $\mu$ L de água deionizada e filtrado usando um filtro de tubo de centrifuga spin-X® (Corning® Costar®, Sigma). Em seguida, 40 $\mu$ L foi injetado em um HPLC Shimadzu SCL-10A vp system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). A quinurenina foi separada usando uma coluna Luna C18 Phenomenex column (250 mm  $\times$  4.6 mm diâmetro interno da coluna; 5  $\mu$ m) com 100% acetona (A) e água deionizada (B) como fases móveis. O gradiente linear começa em A/B = 0/100 e termina em 22 minutos com A/B = 10/90. Em seguida, a fase foi mantida em A/B = 0/100 por 5 minutos. Durante toda a cromatografia, a taxa de vazão foi fixada em 1 mL/min. A detecção foi realizada usando um

detector de díodos SPD-M10A Shimadzu e selecionando o comprimento de onda de 365nm. Para o triptofano, o comprimento de onda utilizado foi de 280 nm. As concentrações das amostras foram calculadas utilizando a curva padrão estabelecida.

#### **4.7. Ensaio Clonogênico**

Para este ensaio, foram selecionadas as linhagens A375 parental e resistente e SK-MEL-28 parental e resistente. Para as linhagens A375 P e R e SK-MEL-28 P, foram plaqueadas 600 células em placas de 6 poços. Para a linhagem SK-MEL-28 R, foram plaqueadas 1800 células em placas de 6 poços. Após a adesão das células – 24 horas, estas foram tratadas com o 1-MT em diferentes concentrações: 0,5, 1,0 e 1,5 mM.

O meio de cultura era trocado de 3 a 4 dias e o 1-MT era novamente adicionado, por um período até 14 dias. Para as linhagens A375 P e R, o ensaio durou 7 dias. Para as linhagens SK-MEL-28 P e R, o ensaio durou 14 dias.

Após o período para a formação das colônias, os poços foram lavados com PBSA, e as colônias formadas foram fixadas e coradas com solução contendo 49,75% de metanol, 49,75% de água deionizada e 0,5% de cristal violeta. As placas foram fotografadas para comparar o efeito do tratamento e a análise de número de colônias e a área ocupada por estas foi realizado conforme Guzmán et al., 2014.

#### **4.8. Ensaio de viabilidade celular - MTT**

A viabilidade celular após exposição ao IFN- $\gamma$  e ao 1-MT foram avaliadas pelo ensaio de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que é baseado na redução desse sal pelo sistema enzimático mitocondrial, através das atividades de desidrogenases que clivam o anel tetrazólico e convertem o MTT em um produto insolúvel denominado formazan, o qual reflete o normal funcionamento da mitocôndria, e conseqüentemente, a viabilidade celular.

O meio de cultura juntamente com o tratamento (IFN- $\gamma$  e 1-MT) foram removidos da placa e as células foram incubadas com MTT diluído em meio de cultura, na concentração de 100  $\mu$ g/mL por 4 horas. Após esse período, o

formazan foi solubilizado em DMSO (dimetilsulfóxido) e em seguida, foi realizada a leitura da absorbância e a quantificação foi feita pela densidade ótica no comprimento de onda de 570 nm em espectrofotômetro (BioTek Instruments Inc.).

#### **4.9. Análise estatística**

Os resultados foram expressões com média e erro padrão e o software utilizado para a análise estatística foi o GraphPad Prism 5.0. Para os experimentos onde havia apenas dois grupos de comparação, foi utilizado o teste t de *Student* (expressão proteica por *Western Blotting*, atividade de IDO por HPLC). Para os experimentos onde havia mais de dois grupos, foi utilizado o teste *One-way Anova*, seguido pelo teste comparativo de *Tukey* (análise *in silico* de IDO na progressão do melanoma). Para os experimentos onde havia mais de dois grupos e duas variáveis, foi utilizado o teste *Two-way Anova* (experimentos com 1-MT junto com o IFN-  $\gamma$  e iBRAF: atividade de IDO por HPLC e ensaio clonogênico). As análises foram consideradas significativas quando os valores de  $p \leq 0,05$ .

## 5. Resultados e discussões

Os resultados serão apresentados e discutidos em 2 capítulos: (1) expressão gênica e proteica de IDO e sua participação na progressão do melanoma – desde do nevo até ao melanoma metastático e (2) expressão gênica e proteica da enzima IDO em linhagens de melanoma parentais e resistentes ao inibidor de BRAF e sua participação na resistência ao tratamento.

### Capítulo I – IDO na progressão do melanoma

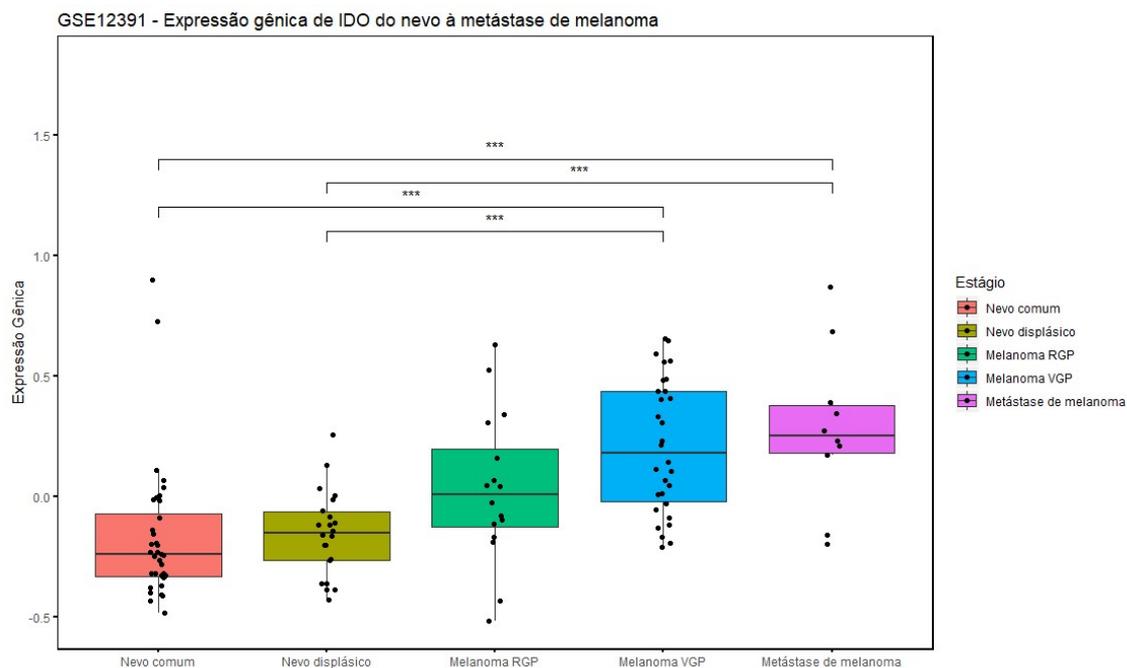
#### 5.1. Expressão gênica de IDO do nevo à metástase: um estudo *in silico*

O estudo GSE12391 foi realizado em 114 amostras de pacientes e foram categorizadas em 5 grupos: nevo comum (n = 36); nevo displásico (n = 22); melanoma com crescimento radial (n = 16); melanoma com crescimento vertical (n = 30) e melanoma metastático (n = 10). O gráfico do tipo *boxplot* se encontra na figura 9.

A análise de variância unidirecional (*One-way Anova*) mostrou uma significância estatística de IDO entre os cinco grupos estudados ( $p < 0.0001$ ). Além disso, a análise posterior entre os grupos, através do teste de comparação múltipla de *Tukey*, demonstrou uma diferença significativa entre os seguintes grupos: nevo comum vs melanoma com crescimento vertical, nevo comum vs metástase de melanoma, nevo displásico vs melanoma com crescimento vertical e nevo displásico vs metástase de melanoma. Os demais grupos não apresentaram resultados estatisticamente significantes.

A expressão gênica de IDO é crescente conforme a progressão do melanoma, ou seja, os menores valores se encontram no grupo de nevo comum e os maiores valores de expressão gênica se encontram no grupo de metástase de melanoma, conforme a figura 9.

**Figura 9.** Expressão gênica de IDO desde o nevo comum até à metástase de melanoma utilizando o banco público GSE12391



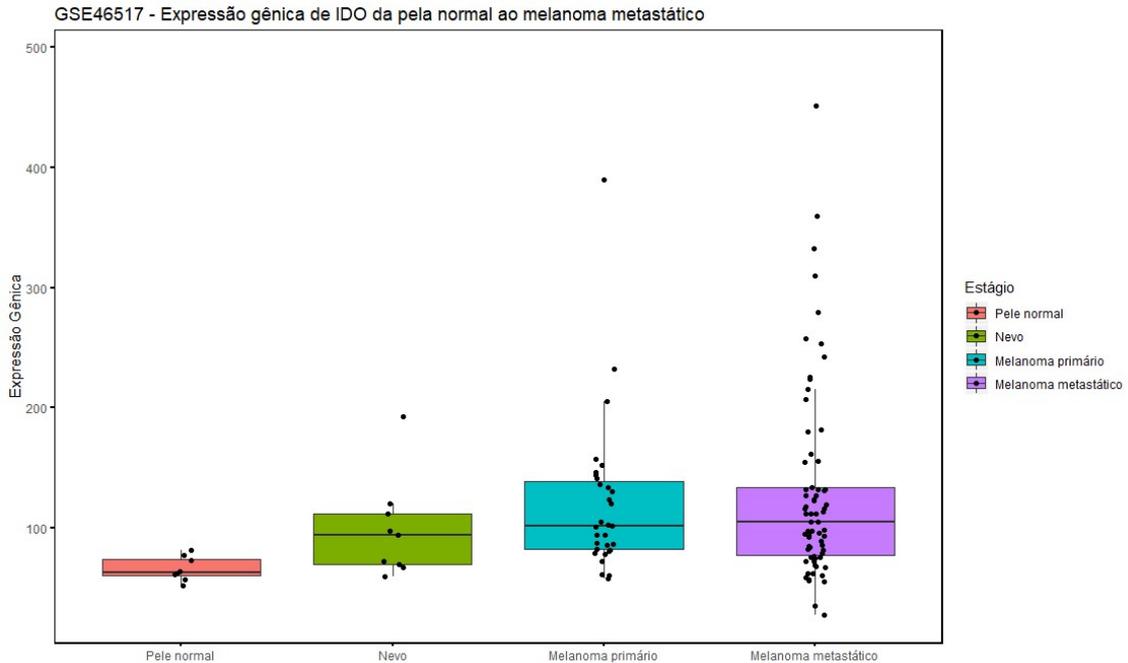
Fonte: autoria própria.

Legenda: gráfico do tipo *boxplot*, onde cada ponto representa a amostra de um paciente. Em cada caixa, as barras representam os quartis: barra inferior (primeiro quartil), barra média (mediana), barra superior (terceiro quartil). As amostras foram divididas em cinco grupos: nevo comum, nevo displásico, melanoma com crescimento radial (RGP), melanoma com crescimento vertical (VGP), metástase de melanoma. O teste estatístico foi o *One-Way Anova*, seguido pelo teste comparativo de *Tukey*. \*\*\* p ajustado < 0.001.

Um segundo estudo foi alvo de análise de bioinformática - o estudo GSE46517, onde foram sequenciadas 121 amostras de pacientes, categorizadas em 4 grupos: pele normal (n = 8); nevo (n = 9); melanoma primário (n = 31) e melanoma metastático (n = 73). O gráfico do tipo *boxplot* se encontra na figura 10.

A análise de variância unidirecional (*One-way Anova*) não mostrou uma significância estatística de IDO entre os quatro grupos estudados. Adicionalmente, as médias da expressão gênica de IDO dos grupos de melanoma primário e metastático foram superiores às médias dos grupos de nevo e de pele normal – entretanto, esta superioridade não foi estatisticamente significativa.

**Figura 10.** Expressão gênica de IDO desde a pele normal até ao melanoma metastático utilizando o banco público GSE46517



Fonte: autoria própria.

Legenda: gráfico do tipo *boxplot*, onde cada ponto representa a amostra de um paciente. As amostras foram divididas em quatro grupos: pele normal, nevo, melanoma primário e melanoma metastático. O teste estatístico foi o *One-Way Anova*, seguido pelo teste comparativo de *Tukey*. Não houve significância estatística entre os 4 grupos analisados.

Uma das possíveis razões para este segundo estudo não apresentar diferença estatística pode ser a maneira como as amostras foram estratificadas. O grupo nevo não foi classificado em comum ou displásico. Além disso, o grupo melanoma primário tampouco foi dividido em crescimento radial ou vertical. Embora não tenha apresentada uma diferença estatística, o perfil do *boxplot* é semelhante ao estudo anterior (figura 9), com maior expressão de IDO no melanoma primário e metastático quando comparada ao nevo.

Além disso, aprofundamos a análise e a composição celular das amostras sequenciadas neste estudo foram avaliadas. É importante esclarecer que estas informações são dados públicos que estão disponíveis no GEO.

Ao analisar as amostras, nota-se que os tipos celulares que a compõem apresentam uma grande variedade – por exemplo, a amostra 99.3 de melanoma metastático (uma amostra das 73 sequenciadas) é composta por 97% de melanócitos e 3% de células inflamatórias e a amostra 69.2 (outra amostra das 73 sequenciadas) é composta por 5% de melanócitos e 95% de células

inflamatórias. É possível que esta heterogeneidade na composição celular das amostras tenha contribuído para que não houvesse diferenças significativas entre os grupos.

Os trabalhos de KIM, EMI e TANABE, 2007; MUNN e MELLOR, 2007; SWANN e SMYTH, 2007 mencionam que a enzima IDO faz parte dos principais mecanismos de tolerância, imunoescape e progressão tumoral, por isso, é esperado que sua expressão esteja aumentada conforme a progressão da doença, e de fato, é isso que observamos no estudo *in silico*. Ou seja, o aumento de IDO faz com que o sistema imune diminua a sua capacidade efetora de eliminar as células tumorais, permitindo a progressão da doença.

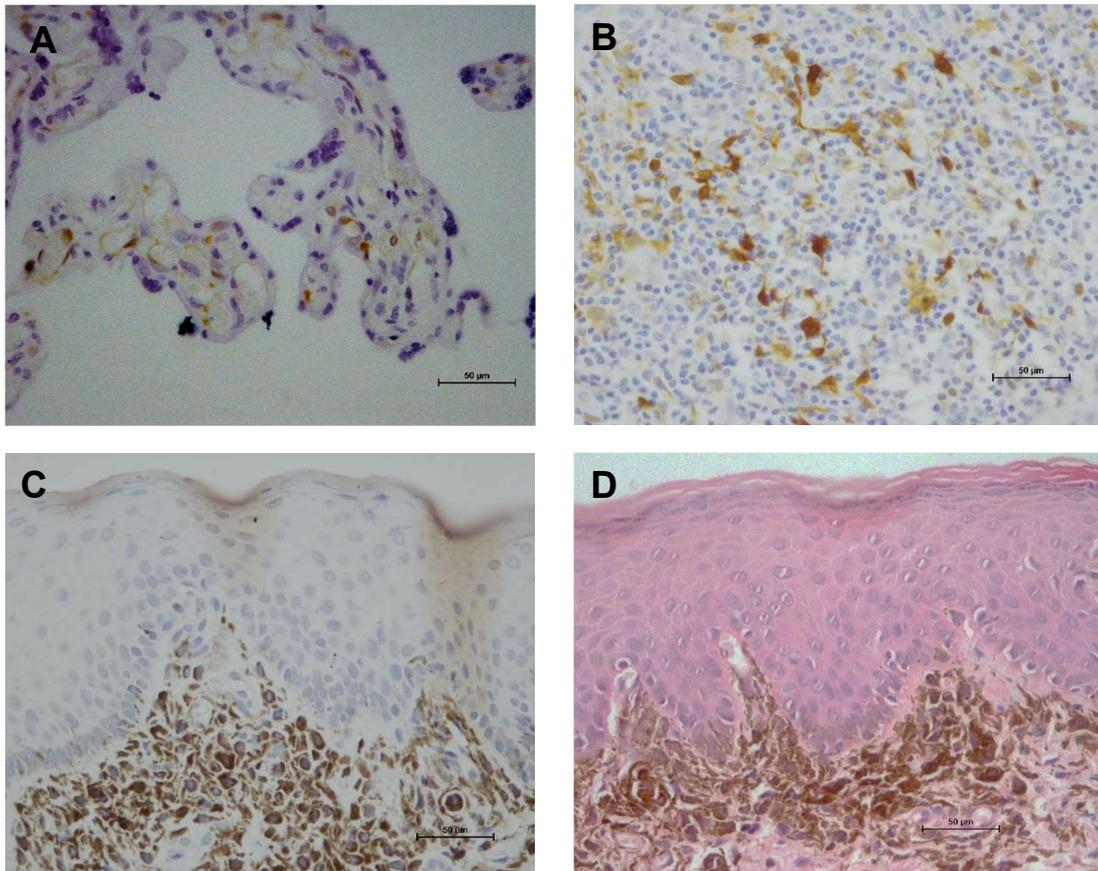
## **5.2. Expressão proteica de IDO do nevo à metástase: imunohistoquímica**

Primeiramente, é importante detalhar a técnica de imunohistoquímica. Ela é baseada na reação antígeno-anticorpo e cuja reação provoca a coloração marrom devido ao revelador DAB. Entretanto, em alguns casos, é possível visualizar uma coloração na lâmina mesmo na ausência de anticorpo e/ou DAB – por exemplo, em lâminas coradas por H&E (hematoxilina e eosina). Isso ocorre em lâminas de melanoma, principalmente, pela presença de melanina e melanófagos. A melanina é o pigmento que confere cor a nossa pele e é produzida pelos melanócitos. Os melanófagos são macrófagos/histiócitos que fagocitam melanina e microscopicamente é caracterizado por um citoplasma grande contendo o pigmento marrom de melanina. São comumente encontrados em sítios inflamatórios. (FUJIMOTO et al, 2015)

Apesar de similares, é possível diferenciar a imunomarcacão antígeno-anticorpo revelado por DAB e a marcação inespecífica de melanina/melanófagos. A imunomarcacão apresenta uma coloração marrom mais intensa, mais viva, enquanto que a marcação inespecífica apresenta uma coloração marrom mais acinzentada.

A figura 11 mostra a imunomarcacão do controle positivo – no caso a placenta de camundongo, de uma amostra de melanoma de paciente e a marcação inespecífica após imunohistoquímica e após H&E.

**Figura 11.** Diferença entre a imunomarcacão de IDO e marcação inespecífica de melanina/melanófagos



Fonte: autoria própria.

Legenda: (A) Controle positivo (placenta de camundongo) - IHQ, (B) Melanoma primário - IHQ, (C) Nevo – IHQ, (D) Nevo – H&E. Imunomarcacão de IDO em (A) e (B). Marcação inespecífica de melanina/melanófagos em (C) e (D). Aumento de 400x.

Para avaliarmos a expressão proteica de IDO na progressão do melanoma, foi realizada a imunohistoquímica em amostras de biópsias de pacientes em diferentes estágios. Foram analisados três casos de nevo – de três pacientes distintos, três casos de melanoma primário – de três pacientes distintos e dois casos de metástase de melanoma – de dois pacientes distintos.

Primeiramente, ao analisar os três casos de nevo, não foi possível encontrar a imunomarcacão de IDO. É importante ressaltar que a marcação encontrada (principalmente na lâmina A), não se trata de IDO (figura 12 – A, B, C), mas de marcação de melanina e melanófagos. Nas lâminas de H&E (figura 12 – A, B, C), onde não se utiliza o anticorpo anti-IDO, também é possível observar tal marcação.

Ao avançar a análise para os casos de melanoma primário, vemos a marcação verdadeira de IDO (figura 12 – D, E, F) – note que o padrão da coloração é distinto dos casos de nevo, onde o marrom é mais intenso e vivo. Nas lâminas coradas com H&E (figura 13 – D, E, F) destas mesmas amostras, nota-se a ausência de qualquer tipo de marcação. Um dado importante a destacar é sobre as amostras de nevo – embora não houvesse marcação de IDO, infiltrados de células do sistema imune estavam presentes. Esse dado descarta a hipótese da ausência de marcação de IDO ser devido à ausência de células do sistema imune.

A presença de IDO ocorre nas três amostras de melanoma primário e a marcação ocorre nos infiltrados linfoides, em células mononucleares, principalmente células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos e células dendríticas. Além disso, não foram encontradas células tumorais de melanoma com a marcação de IDO. A IDO foi encontrada majoritariamente no citoplasma e em algumas células também foi possível localizá-la no núcleo.

Por fim, o último grupo analisado foi de metástase de melanoma, onde somente duas amostras foram analisadas e apresentaram resultados opostos. O primeiro caso (figura 12 – G) também apresentou a marcação de células mononucleares do sistema imune, principalmente apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas) e tampouco houve marcação nas células tumorais. Já o segundo caso (figura 12 – H), não foi possível visualizar a marcação de IDO, mas somente marcação inespecífica de melanina/melanóforos (figura 12 – H e figura 13 – H). É necessário ampliar o número de amostras para uma análise mais abrangente.

A ausência de marcação de IDO nos três casos de nevo e a presença de marcação nos três casos de melanoma primário e em um caso de metástase está em consonância com o estudo de bioinformática GSE12391 mostrando que os estágios mais avançados da doença apresentam uma maior expressão de IDO.

Embora diversos trabalhos demonstraram a expressão constitutiva (ou seja, sem a necessidade de um indutor) de IDO por diferentes tipos de tumor, inclusive, o melanoma (UYTTENHOVE et al., 2003 e HENNEQUART et al., 2017), nas nossas amostras de pacientes, não houve imunomarcagem de IDO nas células tumorais, mas apenas nas células do sistema imune, tanto em

células linfoides como em células apresentadoras de antígeno (macrófagos e células dendríticas).

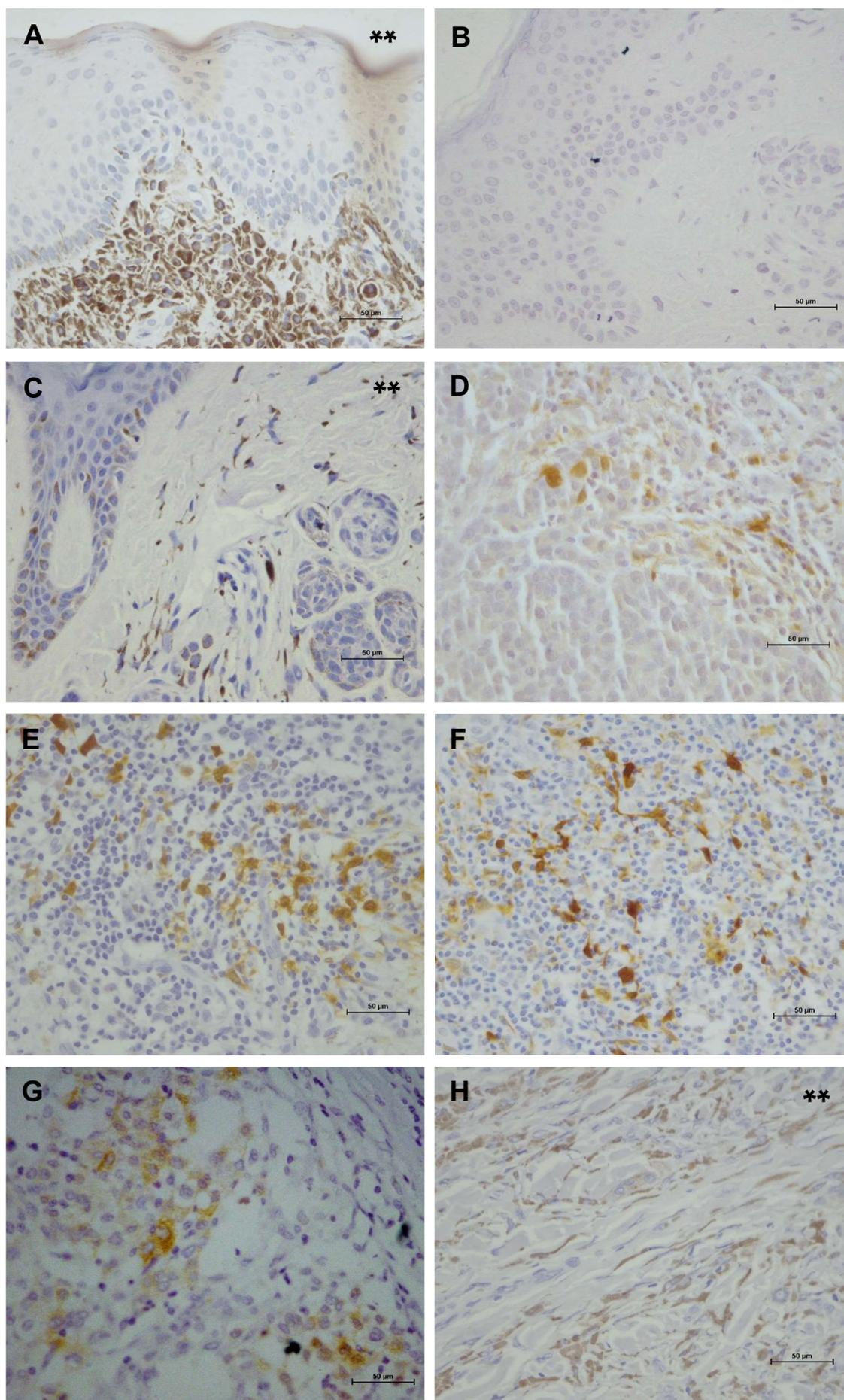
Apesar de não termos identificados aIDO nas células tumorais de melanoma, outros pesquisadores conseguiram esta identificação como RUBEL et al. (2018) e GIDE et al. (2018). RUBEL et al. (2018) não apenas identificou como também correlacionou a expressão deIDO com a espessura do tumor (escala de Breslow) e com a presença de infiltrado linfocitário. Além disso, o referido autor também conseguiu identificar aIDO nas células apresentadoras de antígeno, ponto de acordo com nosso trabalho e assim, RUBEL et al. correlacionou negativamente a expressão deIDO nas APCs com a sobrevida livre de progressão. Já GIDE et al. (2018) mostrou a heterogeneidade na expressão deIDO entre as suas 99 amostras analisadas – além disso, apenas 7/29 (24%) dos melanomas primários foram positivas paraIDO e 11/36 (31%) das metástases loco-regionais foram positivas. Apesar do número reduzido de amostras analisadas neste trabalho, é possível observar que os resultados obtidos estão em consonância com os dados de literatura. É importante destacar que o nosso trabalho analisou amostras de nevo, mostrando a expressão deIDO na progressão da doença, diferenciando-se dos trabalhos já publicados.

Além deste trabalho, outros pesquisadores mostraram que o aumento deIDO diminui a sobrevida do paciente, mostrando a importância deste marcador (BRODY et al., 2009 e SPEECKAERT et al., 2012).

Portanto, a investigação da presença deIDO tem mostrado a sua importância, pois, diversos pesquisadores estão conseguindo correlacionar e estimar a sobrevida do paciente. Além disso, discute-se que pacientes que expressamIDO podem ser responsivos aos inibidores deIDO que estão em testes clínicos (FIDLER, 2018) Um dos possíveis motivos do insucesso do epacadostat, um inibidor deIDO, foi a não avaliação da presença e atividade deIDO nos pacientes. Ou seja, durante os testes clínicos, pacientes cujos tumores não expressavamIDO receberam um inibidor deIDO e provavelmente, não obteve melhora na doença.

Embora aIDO seja descrita como um dos fatores responsáveis pela imunoedição dos tumores, não se encontrou na literatura a correlação da expressão daIDO com a progressão do melanoma – do nevo à metástase, mostrando a relevância dos resultados deste presente trabalho.

**Figura 12.** Expressão proteica de IDO na progressão do melanoma: do nevo à metástase

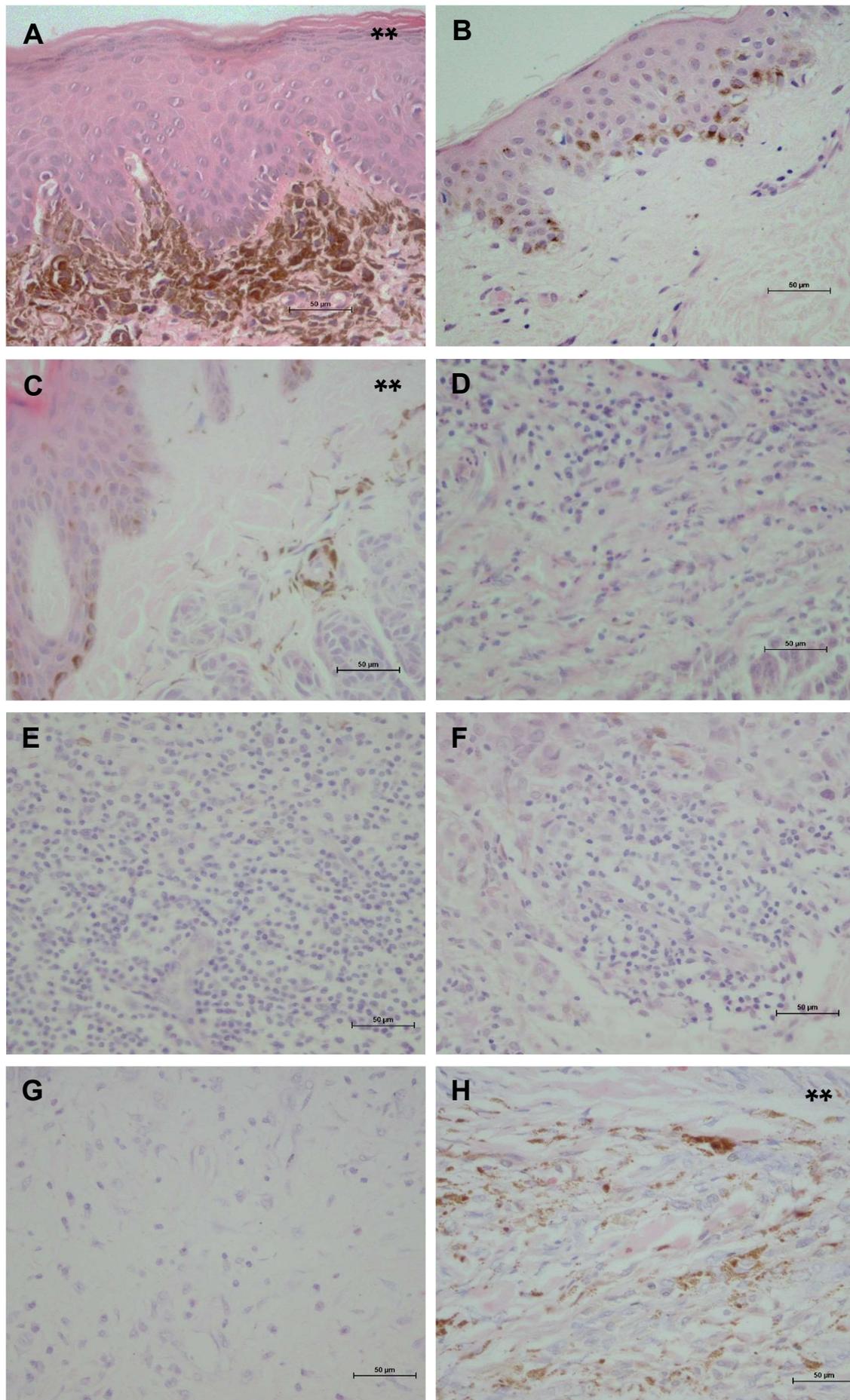


Fonte e legenda: vide verso

Fonte: autoria própria.

Legenda: IHQ de (A, B, C): três amostras de nevo – de três pacientes distintos; (D, E, F): três amostras de melanoma primário – de três pacientes distintos; (G, H): duas amostras de metástase de melanoma – de dois pacientes distintos. \*\*marcação inespecífica de melanina/melanófago – não é imunomarcação de IDO. Aumento de 400x.

**Figura 13.** H&E das lâminas correspondentes à figura 12 - do nevo à metástase



Fonte e legenda: vide verso

Fonte: autoria própria.

Legenda: H&E de (A, B, C): três amostras de nevo – de três pacientes distintos; (D, E, F): três amostras de melanoma primário – de três pacientes distintos; (G, H): duas amostras de metástase de melanoma – de dois pacientes distintos. \*\*marcação inespecífica de melanina/melanófago. Aumento de 400x.

## Capítulo II – IDO na resistência ao iBRAF em melanoma

### 5.3. Expressão gênica de IDO em melanoma – linhagens parentais e resistentes: um estudo *in silico*

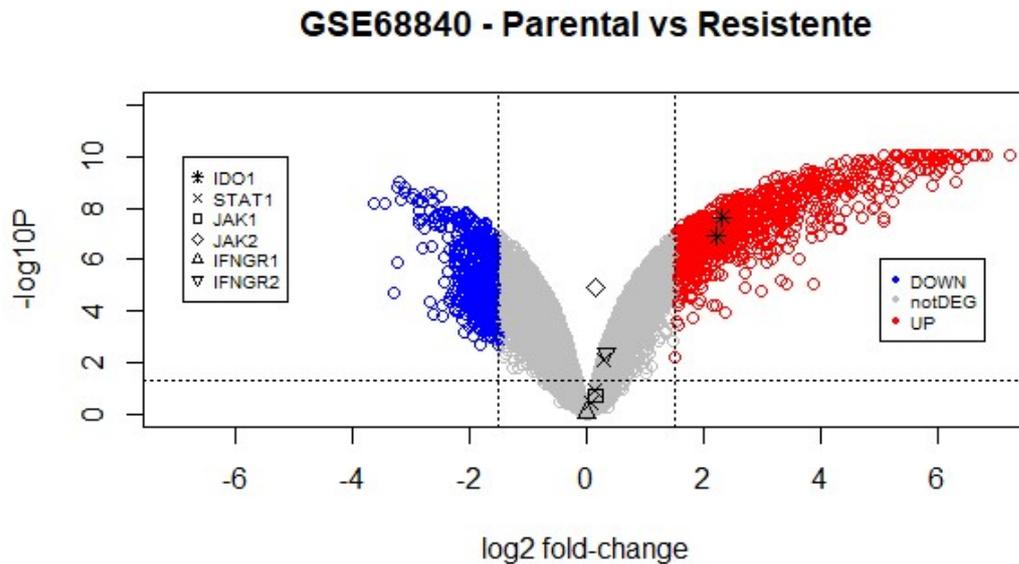
Neste estudo *in silico*, avaliou-se a expressão de IDO e da via JAK-STAT em tumores sensíveis (designados como parentais) e resistentes aos inibidores de BRAF (iBRAF). Novamente, o banco público utilizado foi o Geo do NCBI, e 3 estudos foram avaliados aqui, o GSE68840, o GSE65184, e por fim, o GSE55583.

É importante destacar que os estudos GSE68840 e GSE65184 são análises de melanomas provenientes de pacientes. O GSE68840 avaliou uma metástase de melanoma e clones resistentes ao vemurafenibe foram gerados após exposição contínua ao inibidor de BRAF. Já o GSE65184 avaliou o paciente em dois períodos distintos – antes de iniciar o tratamento e após iniciar, durante a fase de resistência, ou seja, quando o paciente já não respondia mais ao tratamento. E em ambos os estudos, a IDO foi diferencialmente expressa positivamente, conforme figuras 14 e 15. Por fim, o estudo GSE55583 avaliou 5 linhagens comerciais imortalizadas de melanoma e neste caso, a IDO não estava diferencialmente expressa, conforme a figura 16.

O estudo GSE68840 avaliou uma linhagem derivada de uma metástase do linfonodo proveniente de paciente e seu clone resistente ao vemurafenibe, um inibidor de BRAF. De acordo com o gráfico da figura 14, a IDO está positiva e diferencialmente expressa com  $\log_2FC$  maior que 1,5 ( \* na zona vermelha onde se localizam os genes diferencialmente expressos positivamente). O  $\log_2FC$  significa a quantidade de vezes que o gene está positiva ou negativamente expresso. Por exemplo, o  $\log_2FC$  igual a 1 significa que o gene está duas vezes mais expresso. E o  $\log_2FC$  igual a 2, significa que o gene está 4 vezes mais expresso (lembrando que o log é na base 2). Ou seja, neste estudo, a expressão gênica da IDO é 4 vezes maior na linhagem resistente quando comparada a linhagem parental.

Avaliando a toda a via JAK-STAT (IFNGR1, IFNGR2, JAK1, JAK2 e STAT1), nota-se que a via não está diferencialmente expressa (zona cinza do gráfico da figura 14).

**Figura 14.** Genes diferencialmente expressos entre linhagens parental e resistente ao vemurafenibe utilizando o banco de dados público GSE68840

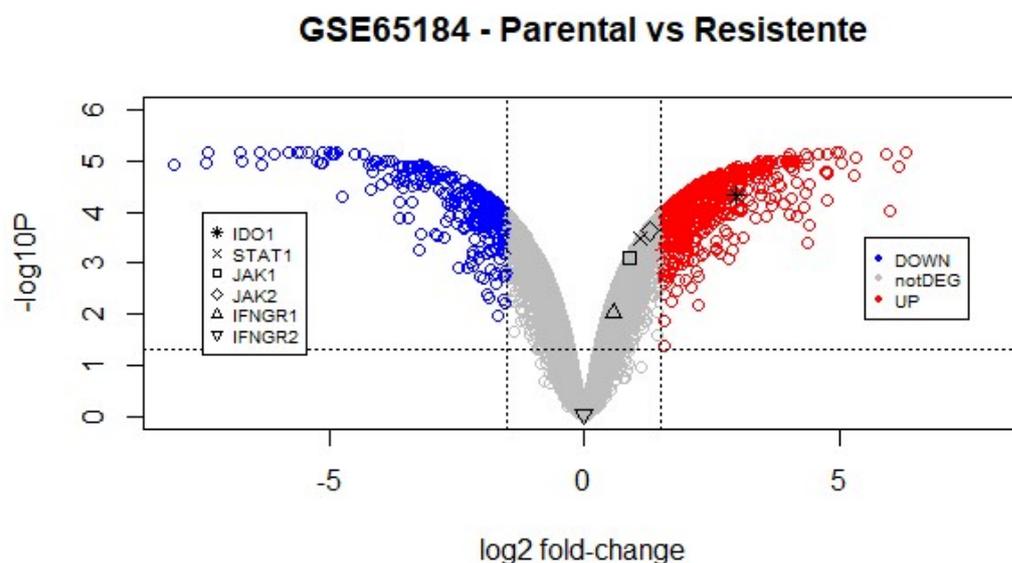


Fonte: autoria própria.

Legenda: cada círculo representa um gene. Dentre 29285 genes analisados, 27591 não estavam diferencialmente expressos (em cinza), 719 estavam diferencialmente expressos negativamente (em azul) e 975 estavam diferencialmente expressos positivamente (em vermelho). A via JAK-STAT-IDO foi analisada e apenas IDO estava diferencialmente expressa positivamente. Foram considerados genes diferencialmente expressos aqueles que apresentaram  $\log_2FC$  maior que 1,5 e valor de P ajustado menor que 0,05.

Já o estudo GSE65184 (figura 15) avaliou um paciente antes do tratamento com vemurafenibe e após o tratamento, durante a resistência ao tratamento. Os resultados foram semelhantes ao estudo GSE68840. A IDO está positiva e diferencialmente expressa, enquanto que toda a via JAK-STAT (IFNGR1, IFNGR2, JAK1, JAK2 e STAT1) não apresenta níveis de alteração de expressão. O principal indutor de IDO é o IFN- $\gamma$  e a via JAK-STAT é a via canônica de sinalização para indução de IDO após estímulo por IFN- $\gamma$ . Neste estudo, a expressão de IDO é cerca de 8 vezes ( $\log_2FC$  cerca de 3) maior durante a resistência ao iBRAF quando comparado ao período pré-tratamento.

**Figura 15.** Genes diferencialmente expressos antes e após (durante resistência) tratamento com vemurafenibe utilizando o banco de dados público GSE65184

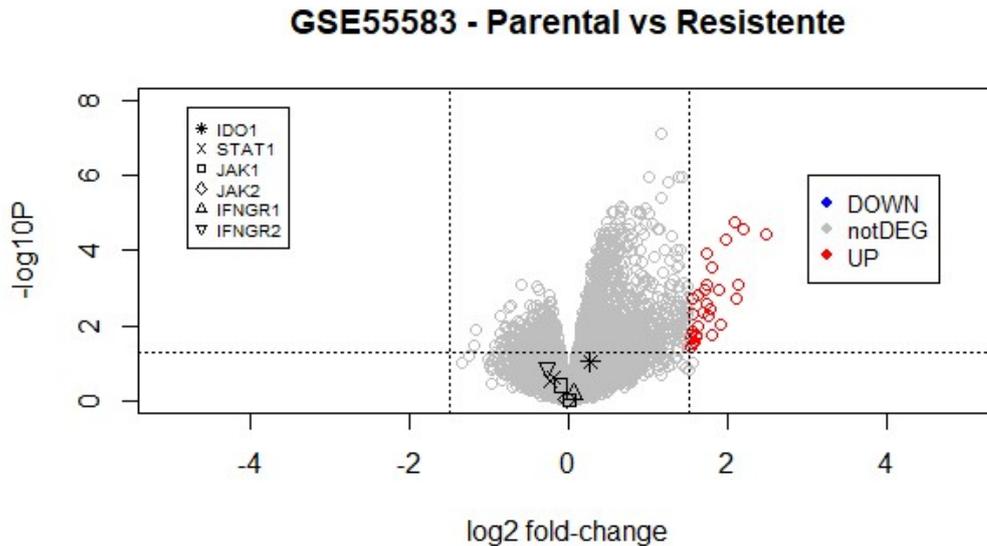


Fonte: autoria própria.

Legenda: cada círculo representa um gene. Dentre 29329 genes analisados, 28422 não estavam diferencialmente expressos (em cinza), 284 estavam diferencialmente expressos negativamente (em azul) e 623 estavam diferencialmente expressos positivamente (em vermelho). A via JAK-STAT-IDO foi analisada e apenas IDO estava diferencialmente expressa positivamente. Foram considerados genes diferencialmente expressos aqueles que apresentaram log<sub>2</sub>FC maior que 1,5 e valor de P ajustado menor que 0,05.

Por fim, o estudo GSE55583 avaliou 5 linhagens diferentes de melanoma (SK-MEL-28, M14, M288, Colo829 e M238) e comparou os clones resistentes ao vemurafenibe com sua linhagem parental. Conforme a figura 16, IDO e nem a via JAK-STAT estão diferencialmente expressos, apresentando um valor de P ajustado menor que 0,05 e log<sub>2</sub>FC menor que 1,5 (zona cinza do gráfico 16).

**Figura 16.** Genes diferencialmente expressos entre linhagens parentais e resistentes ao vemurafenibe utilizando o banco de dados público GSE55583



Fonte: autoria própria.

Legenda: cada círculo representa um gene. Dentre 40987 genes analisados, 40958 não estavam diferencialmente expressos (em cinza), nenhum gene estava diferencialmente expresso negativamente (em azul) e 29 estavam diferencialmente expressos positivamente (em vermelho). A via JAK-STAT-IDO foi analisada e nenhum gene da via apresentou expressão diferencialmente significativa. Foram considerados genes diferencialmente expressos aqueles que apresentaram log<sub>2</sub>FC maior que 1,5 e valor de P ajustado menor que 0,05.

É possível observar que nos dois estudos onde se analisou o tumor do paciente, a IDO estava positiva e diferencialmente expressa (GSE68840 e GSE65184 – figuras 14 e 15) – ou seja, é provável que os tumores, dentro do contexto de microambiente tumoral, sofreram exposição ao IFN- $\gamma$  e outras citocinas, e por isso, a IDO se apresentou positivamente regulada.

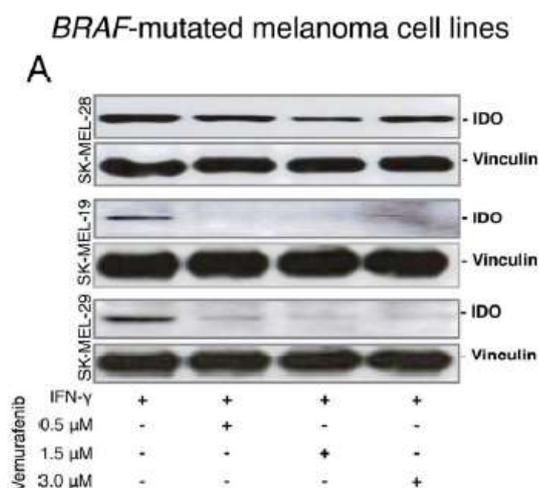
Além disso, os resultados do GSE55583 podem refletir o nosso modelo experimental, onde é necessário adicionar o IFN- $\gamma$  a fim de induzir as células de melanoma a produzirem a IDO.

## 5.4. Expressão proteica de IDO em melanoma – linhagens parentais e resistentes ao vemurafenibe

### 5.4.1. Linhagens com mutação BRAFV600E

A abordagem inicial realizada por Sandri e colegas em nosso trabalho prévio era de se usar diferentes concentrações do inibidor de BRAF, o vemurafenibe, para verificar se a expressão de IDO poderia ser alterada de uma maneira dose dependente. Os resultados obtidos para as linhagens parentais da SK-MEL-19, SK-MEL-29 e SK-MEL-28 estão na figura 17. Nota-se que para a linhagem SK-MEL-19 e SK-MEL-29, a expressão de IDO é abolida ao se adicionar a menor concentração do vemurafenibe. Enquanto que a linhagem SK-MEL-28 tem a expressão de IDO ligeiramente diminuída.

**Figura 17.** Expressão proteica de IDO em diferentes concentrações do iBRAF



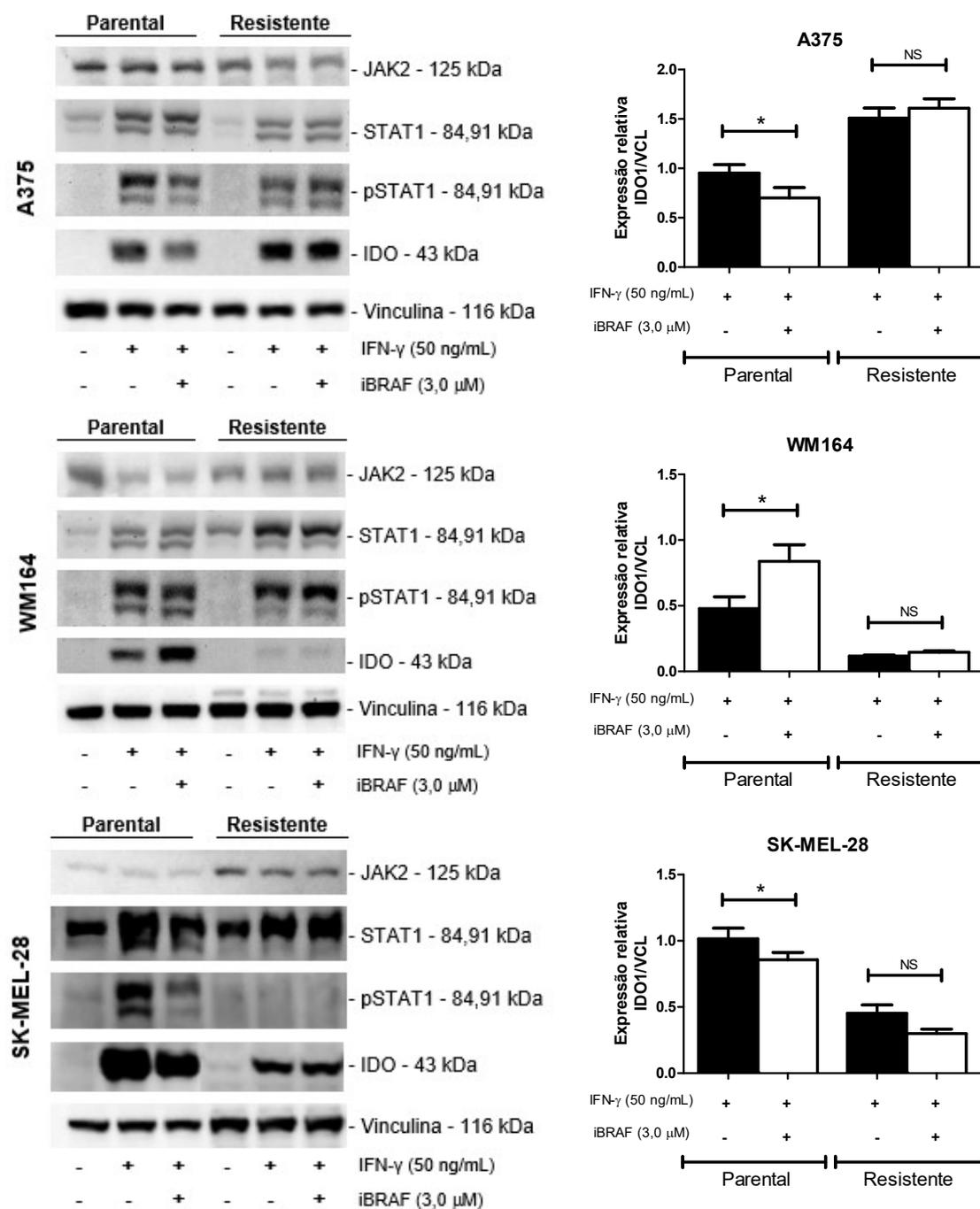
Fonte: SANDRI et al., 2015, (dados não publicados).

Legenda: expressão proteica de IDO em relação ao endógeno vinculina das linhagens parentais da SK-MEL-28, SK-MEL-19 e SK-MEL-29 em três concentrações de vemurafenibe (0,5 μM, 1,5 μM e 3,0 μM), sempre na presença de IFN-γ (50 ng/mL). Os dados são representativos de três experimentos independentes

A adição de IFN-γ é necessária para induzir a produção de IDO. Sem a adição de IFN-γ, as linhagens de melanoma não expressam IDO. Este fato está em consonância com os resultados de bioinformática do estudo GSE55583 (figura 16). Neste estudo, foram analisadas apenas linhagens comerciais parentais e resistentes sem a adição de IFN-γ, e o resultado mostra que IDO não estava diferencialmente expresso.

Para aumentar este painel de células em busca de estudos mais abrangentes, que representem de fato a heterogeneidade do tumor, analisamos também as linhagens A375 e WM164, parental e resistente, e repetimos os experimentos com a linhagem SK-MEL-28 parental e também complementamos com o seu par de resistente, conforme figura 18.

**Figura 18.** Expressão proteica da via JAK-STAT-IDO das linhagens parentais e resistentes da A375, WM164 e SK-MEL-28 e a respectiva quantificação proteica de IDO



Fonte e legenda: vide verso

Fonte: autoria própria.

Legenda: **Coluna à esquerda:** expressão proteica da via JAK-STAT-IDO das linhagens parentais e resistentes da A375, WM164 e SK-MEL-28. **Coluna à direita:** respectiva quantificação da expressão de IDO em relação ao endógeno vinculina (VCL). Os dados são representativos de três experimentos independentes e as barras representam o erro padrão. O teste estatístico foi o teste t de *Student*. \*  $p < 0,05$ , ns = não significativo.

A linhagem A375 parental mostrou uma diminuição de IDO na presença de vemurafenibe, porém, não há abolição na expressão de IDO como vista nas linhagens SK-MEL-19 e SK-MEL-29. Já a linhagem WM164 parental mostrou um comportamento oposto, tendo a produção de IDO aumentada após adição de vemurafenibe.

Ao avaliar as linhagens resistentes A375, WM164 e SK-MEL-28, notamos comportamentos distintos em relação a expressão de IDO induzida pelo IFN- $\gamma$  quando comparamos com suas respectivas linhagens parentais. A SK-MEL-28 resistente expressa menos IDO que sua linhagem parental e a presença de vemurafenibe não altera o padrão de expressão. Já a linhagem A375 resistente expressa mais IDO que sua linhagem parental e a presença de vemurafenibe tampouco altera o padrão de expressão, assim como na linhagem SK-MEL-28. Por fim, a linhagem WM164 resistente, a expressão de IDO é quase nula (figura 18).

Esta diferença de expressão entre as linhagens utilizadas pode ser decorrente da heterogeneidade tumoral. GIDE et al. (2018) mostrou a heterogeneidade na expressão de IDO na análise de 99 amostras de melanoma. Esta autora, inclusive, mostrou uma intra-heterogeneidade na expressão de IDO – ou seja, em um mesmo paciente, a expressão de IDO variava conforme o local da biópsia (melanoma primário ou sítio metastático).

Ao analisar a via JAK-STAT-IDO, percebe-se que há uma correspondência entre a expressão de IDO e a forma fosforilada de STAT1 (pSTAT1). A forma fosforilada é a forma ativa da proteína e seu dímero é a forma que se transloca para o núcleo celular para ativação dos genes correspondentes, incluindo a IDO. Nas linhagens A375 e SK-MEL-28 parental, houve diminuição de IDO após adição do inibidor de BRAF, assim como houve diminuição de pSTAT1.

Entretanto, para outras linhagens, como as linhagens resistente da SK-MEL-28 e WM164, não houve uma correspondência. Para a linhagem WM164

resistente, nota-se que há uma grande quantidade de pSTAT1, entretanto, a IDO quase não é expressa. O inverso se observa com a linhagem SK-MEL-28 resistente, onde pSTAT1 não está presente, embora, IDO esteja bastante expressa. Neste caso, é possível que já tenha ocorrido a desfosforilação de STAT1 é importante lembrar que a extração proteica ocorre após 24h de tratamento – ou seja, neste tempo de 24h, a STAT1 foi fosforilada, o gene IDO foi transcrito e traduzido em proteína e é possível que já tenha ocorrida a desfosforilação. Portanto, ao analisar o resultado de bioinformática com os dados de expressão proteica, é possível concluir que o inibidor de BRAF atua no nível proteico, pois, a via JAK-STAT não apresentava alterações de mRNA, entretanto, o nível de pSTAT1, e conseqüentemente de IDO, passaram a ser modulado pelo inibidor de BRAF.

O inibidor de BRAF possui diversos *off-targets*, e é possível que a STAT1 seja um desses *off-targets* e por isso, consegue regular (aumentar ou diminuir) a expressão de IDO. Entretanto, essa regulação parece ocorrer de maneira inespecífica, pois, há linhagens onde houve aumento (WM164 P), outras que houve diminuição de IDO (A375 P, SK-MEL-28 P) e outras que não houve alteração (A375 R, WM164 R e SK-MEL-28 R).

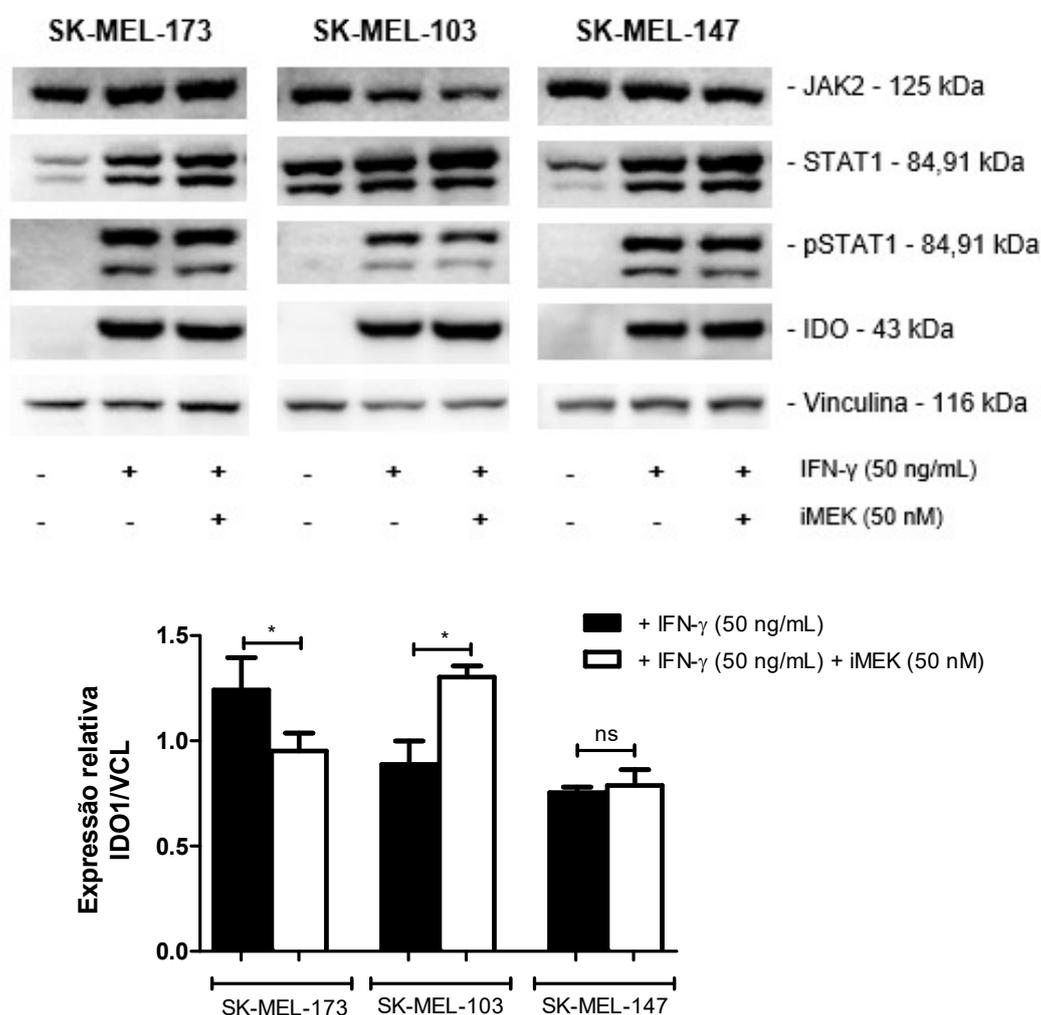
Uma publicação recente de PELSTER e AMARIA (2019) apresenta um compilado de estudos mostrando que a inibição da via MAPK (seja por inibidores de BRAF e/ou inibidores de MEK) favorece a atuação do sistema imune sobre os tumores por diversos mecanismos. Entre estes mecanismos estão o aumento de infiltrado de linfócitos T no tumor, aumento de apresentação de antígenos por células apresentadoras e modulação de moléculas e citocinas estimulatórias/supressoras.

Um dos estudos citados é o trabalho de WILMOTT et al. (2012), onde mostrou-se que inibidores de BRAF aumentavam o infiltrado de linfócitos T no tumor de melanoma, entretanto, os mecanismos moleculares não foram descritos. É possível que um desses mecanismos tenha ocorrido pela modulação de IDO, através da diminuição de pSTAT1. Conforme revisado por MUNN e MELLOR (2016), a IDO leva a uma série de efeitos no sistema imune, principalmente, a uma diminuição de células T efetoras e também a produção de citocinas inibitórias, como a IL-10 e TGF- $\beta$  pelas células apresentadoras de antígenos.

#### 5.4.2. Linhagens sem a mutação BRAFV600E

Foi levantada a hipótese da regulação de IDO não estar relacionada a mutação BRAFV600E e seu inibidor, mas estar relacionada com a inibição da via MAPK. Para verificar tal hipótese, utilizou-se 3 linhagens selvagem para a mutação BRAFV600E, porém, com mutação em NRAS: SK-MEL-173, SK-MEL-103 e SK-MEL-147. Para a inibição da via, foi utilizado um inibidor de MEK, o trametinibe, na concentração de 50 nM.

**Figura 19.** Expressão proteica da via JAK-STAT-IDO das linhagens SK-MEL-173, SK-MEL-103 e SK-MEL-147 e a respectiva quantificação proteica de IDO



Fonte: autoria própria.

Legenda: expressão proteica da via JAK-STAT-IDO das linhagens SK-MEL-173, SK-MEL-103 e SK-MEL-147 e a respectiva quantificação da expressão de IDO em relação ao endógeno Vinculina (VCL). Os dados são representativos de três experimentos independentes e as barras representam o erro padrão. O teste estatístico foi o teste t de *Student*. \*  $p < 0,05$ , ns = não significativo.

A resposta da regulação de IDO induzida por IFN- $\gamma$  através da inibição de MEK foi heterogênea: a linhagem SK-MEL-173 teve a expressão diminuída após adição do inibidor de MEK, a linhagem SK-MEL-103 teve a expressão aumentada após adição do inibidor de MEK e a linhagem SK-MEL-147 não teve a expressão de IDO alterada (figura 19).

De acordo com a revisão de PELSTER e AMARIA (2019) e conforme já discutido acima, a inibição da via MAPK (seja por inibidores de BRAF e/ou inibidores de MEK) favorece a atuação do sistema imune sobre os tumores, e a regulação de IDO pode ser um dos mecanismos envolvidos. A inibição da via MAPK utilizando um inibidor de MEK mostrou uma maior heterogeneidade de resposta (cada linhagem respondeu de uma maneira diferente). É relevante destacar que a modulação de IDO ocorreu independente da mutação em BRAF – nestas três linhagens utilizadas, elas eram BRAF selvagem e mesmo assim, a inibição da via MAPK conseguiu regular a expressão de IDO.

Neste cenário, o inibidor de MEK também possui seus *off-targets* e STAT1 também pode um desses *off-targets*. Na linhagem SK-MEL-173 onde há a diminuição de IDO, também se observa a diminuição de pSTAT1. E assim como o inibidor de BRAF, essa modulação parece ocorrer de maneira inespecífica, pois, na linhagem SK-MEL-103 o aumento de IDO não foi acompanhada pelo aumento de pSTAT1.

Além disso, o fato de cada linhagem mostrar uma resposta diferente não surpreende, quando se traz a heterogeneidade tumoral – já discutida nos resultados acima quando se utilizou o inibidor de BRAF em linhagens contendo a mutação BRAFV600E.

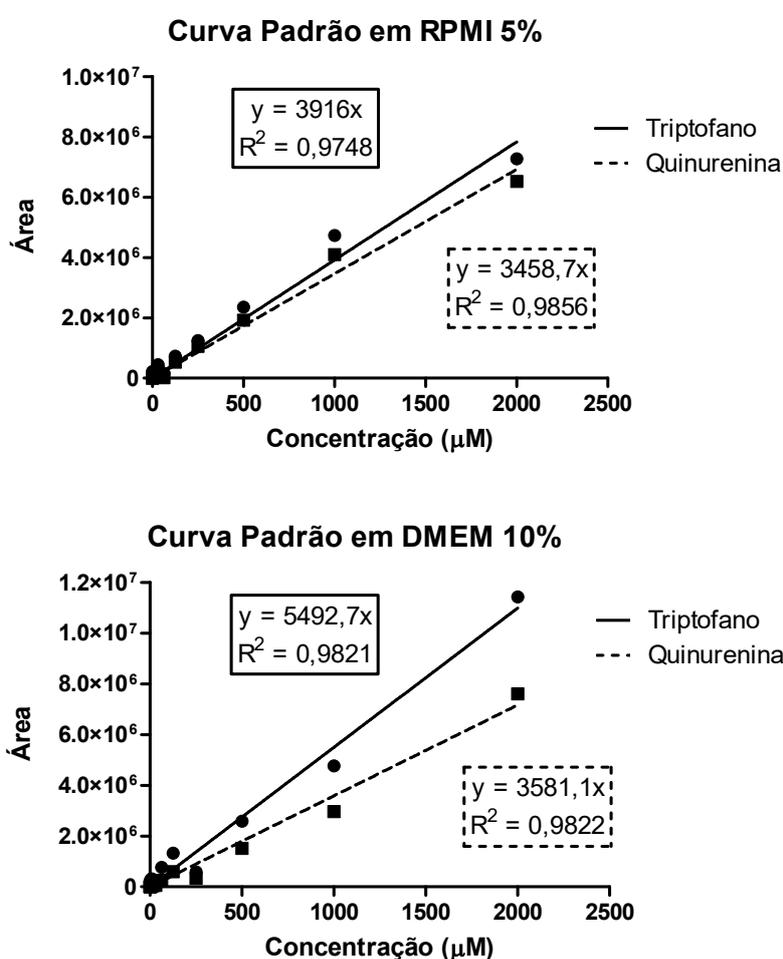
É válido ressaltar que, para as condições utilizadas nestes ensaios (figura 18 e 19), foi avaliada a viabilidade celular frente aos tratamentos e os resultados se encontram no item 5.8.1., figura 30 e tabela 2.

## 5.5. Ensaio de atividade de IDO: quantificação de quinurenina por HPLC

### 5.5.1. Curva padrão

Primeiramente, foram feitas as curvas-padrões para posterior quantificação do triptofano e da quinurenina. As curvas-padrões juntamente com a equação da reta e o  $R^2$  em meio RPMI 5% e DMEM 10% estão ilustradas na figura 20.

**Figura 20.** Curva-padrão do triptofano e quinurenina em meio RPMI 5% e DMEM 10%



Fonte: autoria própria.

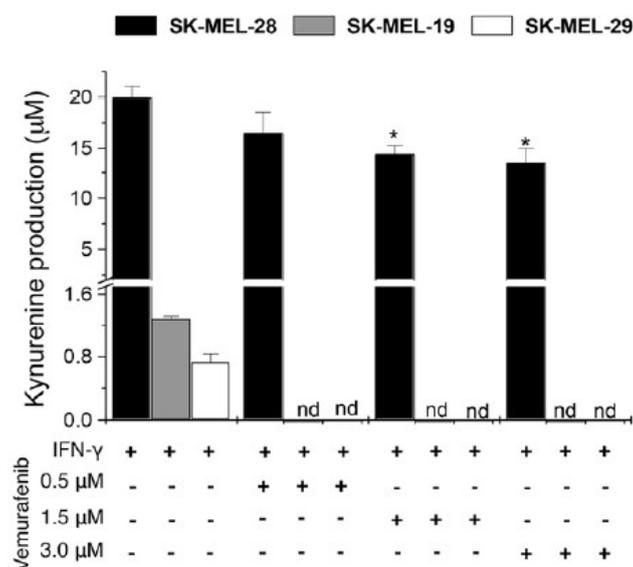
Legenda: curva padrão de triptofano (linha contínua) e quinurenina (linha tracejada) com a respectiva equação de reta e  $R^2$  em meio RPMI 5% (gráfico acima) e DMEM 10% (gráfico abaixo).

### 5.5.2. Linhagens com a mutação BRAFV600E

Sandri e colegas já haviam determinado a atividade de IDO para as linhagens SK-MEL-19, SK-MEL-29 e SK-MEL-28 (dados não publicados), conforme a figura 21. O ensaio da atividade de IDO foi realizada através da produção de quinurenina, o metabólito resultante do consumo de triptofano pela enzima IDO.

Nota-se que para a linhagem SK-MEL-19 e SK-MEL-29, a produção de quinurenina é abolida ao se adicionar o vemurafenibe. Enquanto que a linhagem SK-MEL-28 tem a produção de quinurenina diminuída, a partir da concentração de 1,5  $\mu\text{M}$  (figura 21).

**Figura 21.** Concentração de quinurenina das linhagens SK-MEL-28, SK-MEL-19 e SK-MEL-29



Fonte: Sandri e colegas (dados não publicados), 2015

Legenda: concentração de quinurenina em três concentrações de vemurafenibe (0,5  $\mu\text{M}$ , 1,5  $\mu\text{M}$  e 3,0  $\mu\text{M}$ ), sempre na presença de IFN- $\gamma$  (50 ng/mL). As barras representam o erro padrão de três experimentos independentes. O teste estatístico foi o *One-Way Anova*, seguido pelo teste comparativo de *Newman-Keuls*. \*:  $p < 0,05$ , nd = não detectável.

Complementando o painel de melanoma utilizado, foram analisadas as linhagens A375 e WM164, parental e resistente e foi repetido a linhagem SK-MEL-28 parental e complementado com sua linhagem resistente.

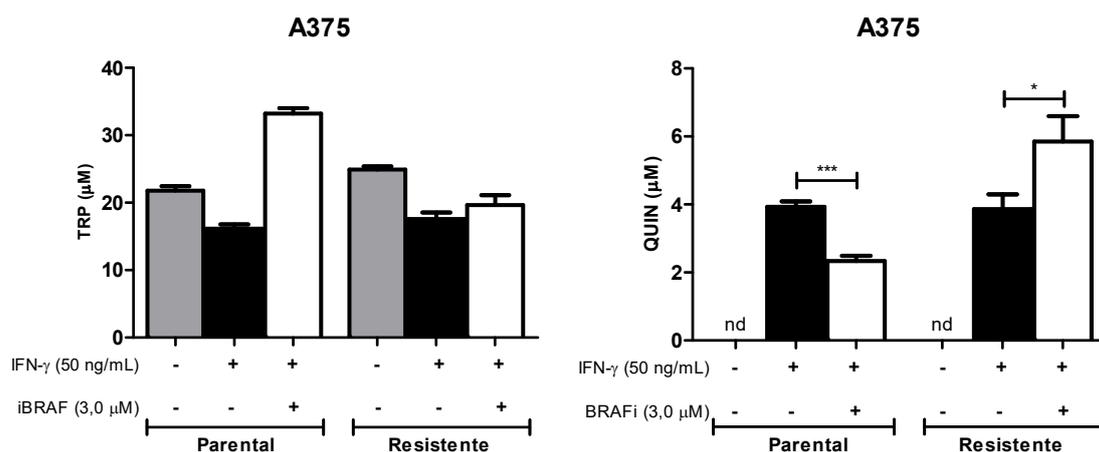
Para a linhagem A375 parental, observa-se que a presença do inibidor de BRAF, diminui a atividade enzimática de IDO e o comportamento oposto (aumento da atividade de IDO) se observa na linhagem resistente (figura 22).

Este comportamento está em consonância com os resultados de expressão proteica. Para a A375 parental, é observada uma diminuição na expressão de IDO e também diminuição da quinurenina medida – provavelmente, pela menor expressão da enzima IDO.

A linhagem resistente da A375 apresentou um aumento na atividade de IDO (maior quantidade de quinurenina), embora, o aumento da expressão proteica não fora estatisticamente significativa.

A linhagem SK-MEL-28 parental apresentou comportamento similar a A375 parental, onde a adição do inibidor de BRAF, diminuiu significativamente a produção de quinurenina, por diminuir a expressão da enzima IDO (figura 23 e 18).

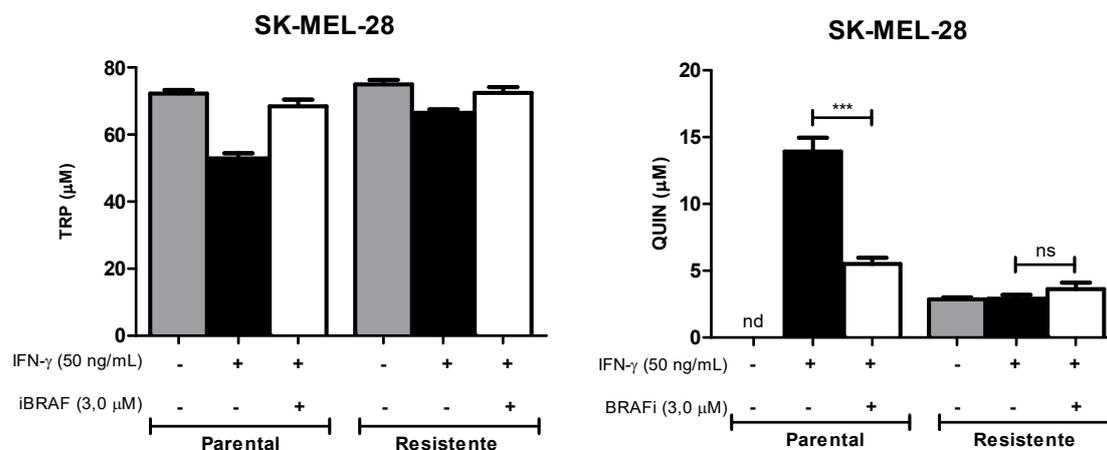
**Figura 22.** Concentração de triptofano e quinurenina na linhagem parental e resistente da A375



Fonte: autoria própria

Legenda: Gráfico à esquerda: concentração de triptofano na linhagem parental e resistente da A375. Gráfico à direita: concentração de quinurenina na linhagem parental e resistente da A375. TRP: triptofano, QUIN: quinurenina, (+) presença, (-) ausência. **As barras representam** o erro padrão de três experimentos independentes. O teste estatístico foi o teste t de *Student*. \*:  $p < 0,05$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , nd = não detectável.

**Figura 23.** Concentração de triptofano e quinurenina na linhagem parental e resistente da SK-MEL-28.



Fonte: autoria própria

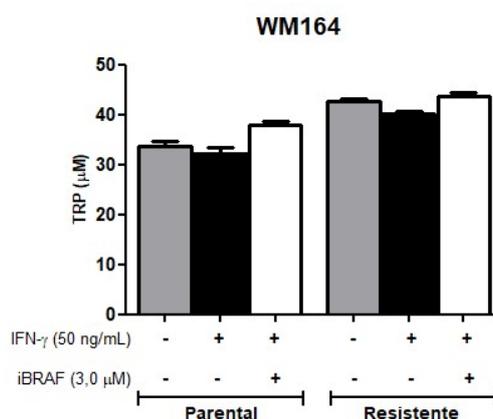
Legenda: Gráfico à esquerda: concentração de triptofano na linhagem parental e resistente da SK-MEL-28. Gráfico à direita: concentração de quinurenina na linhagem parental e resistente da SK-MEL-28. TRP: triptofano, QUIN: quinurenina, (+) presença, (-) ausência. As barras representam o erro padrão de três experimentos independentes. O teste estatístico foi o teste t de *Student*. \*:  $p < 0,05$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , nd = não detectável.

O grupo controle (sem adição de IFN- $\gamma$  + inibidor de BRAF) não apresentou quantidades detectáveis de quinurenina – condizendo com os dados de expressão proteica, exceto pela linhagem SK-MEL-28 resistente. Embora, a expressão proteica mostre que a enzima IDO não está presente na ausência de IFN- $\gamma$ , a quinurenina estava presente. É importante lembrar do metabolismo do triptofano para quinurenina, onde há outras enzimas como TDO e IDO2 que fazem essa conversão e provavelmente, a linhagem SK-MEL-28 resistente expresse constitutivamente uma destas enzimas – o que justificaria a presença de quinurenina mesmo na ausência de IFN- $\gamma$ .

A terceira linhagem analisada foi a WM164, que foi a única linhagem com comportamento oposto após a adição do inibidor de BRAF, onde as outras linhagens apresentavam uma diminuição da proteína IDO, enquanto a WM164 mostrou um aumento de IDO (figura 18).

E de maneira inesperada, a linhagem WM164, parental e resistente, a quantidade de quinurenina foi indetectável para todos os grupos (controle, com adição de IFN- $\gamma$  e com adição de IFN- $\gamma$  + inibidor de BRAF), embora, a enzima IDO estivesse presente – conforme expressão proteica (figura 18).

**Figura 24.** Concentração de triptofano na linhagem parental e resistente da WM164



Fonte: autoria própria

Legenda: concentração de triptofano na linhagem parental e resistente da WM164. TRP: triptofano, QUIN: quinurenina, (+) presença, (-). As barras representam o erro padrão de três experimentos independentes.

Diante destes resultados, é possível especular duas situações: ou a enzima IDO não está funcionalmente ativa, não conseguindo metabolizar o triptofano ou o metabólito quinurenina foi degradado e convertido em outra molécula. A segunda hipótese é descartada quando observamos a concentração de triptofano. Percebe-se que para os três grupos na figura 24, tanto para linhagem parental quanto para resistente, o consumo de triptofano é semelhante, ou seja, não houve consumo de triptofano. A adição de IFN- $\gamma$  induziu a transcrição e tradução da proteína IDO, porém, ela não está metabolizando o triptofano em quinurenina.

A IDO é uma enzima com um grupo heme ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e há alguns mecanismos pós-traducionais que controlam sua atividade, como acetilação no porção N-terminal, nitração em resíduos de tirosina e fosforilação em resíduos de tirosina para posterior ubiquitinação e degradação proteassomal. (FUJIGAKI, SEISHIMA e SAITO, 2012 e HORNYÁK et al., 2018). É possível que algum destes mecanismos esteja envolvido para que as linhagens WM164 parental e resistente não produzissem quinurenina, mesma na presença da enzima.

Além disso, outro possível motivo da IDO não estar ativa pode ser ela estar na conformação 'apo', ou seja, sem o grupo heme. NELP et al. (2018), verificou que a linhagem tumoral de ovário, SKOV3, apresentava 85% das proteínas na conformação 'apo' e que a adição de heme exógeno aumentou em cinco vezes a produção de quinurenina.

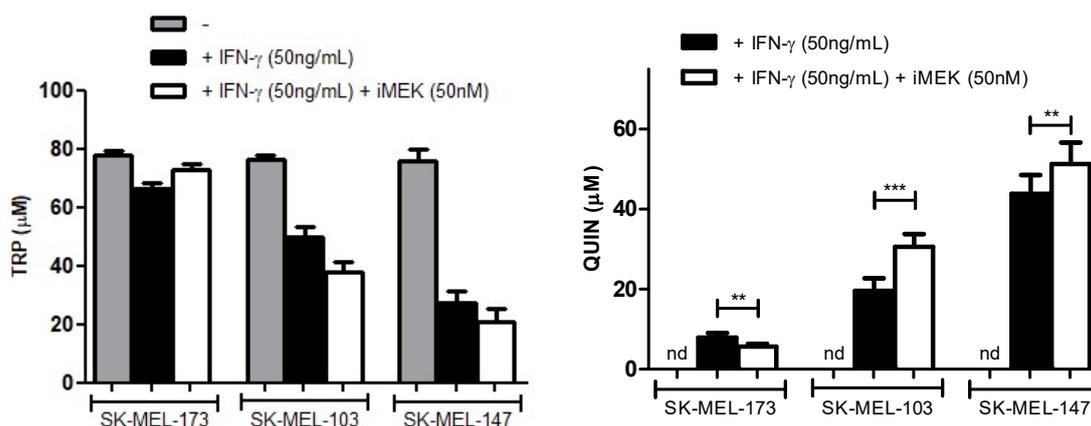
### 5.5.3. Linhagens sem a mutação BRAFV600E

Da mesma maneira, quantificou-se a presença de quinurenina para três linhagens selvagem para a mutação BRAFV600E, porém, com mutação em NRAS: SK-MEL-173, SK-MEL-103 e SK-MEL-147.

Houve duas respostas distintas da regulação de IDO induzida por IFN- $\gamma$  após a adição do inibidor de MEK. A linhagem SK-MEL-173 apresentou uma menor atividade de IDO, ou seja, uma diminuição na produção de quinurenina e este resultado está em concordância com o resultado de expressão proteica (figura 19), onde houve menos expressão de IDO após adição de iMEK.

As linhagens SK-MEL-103 e SK-MEL-147 apresentaram comportamento oposto a linhagem SK-MEL-173. Elas apresentaram um aumento na quantidade de quinurenina, ou seja, um aumento na atividade de IDO, após adição de iMEK. Para a linhagem SK-MEL-103, este resultado não surpreende, pois está em concordância com os resultados de expressão proteica (figura 19) – assim como a linhagem SK-MEL-173. Entretanto, a linhagem SK-MEL-147 apresentou um aumento na atividade de IDO (maior quantidade de quinurenina), embora, não houvera alteração na expressão proteica.

**Figura 25.** Concentração de triptofano e quinurenina nas linhagens SK-MEL-173, SK-MEL-103 e SK-MEL-147



Fonte: autoria própria

Legenda: Gráfico à esquerda: concentração de triptofano nas linhagens SK-MEL-173, SK-MEL-103 e SK-MEL-147. Gráfico à direita: concentração de quinurenina triptofano nas linhagens SK-MEL-173, SK-MEL-103 e SK-MEL-147. TRP: triptofano, QUIN: quinurenina, iMEK: inibidor de MEK, trametinibe. As barras representam o erro padrão de três experimentos independentes. O teste estatístico foi o teste t de *Student*. \*\*: p < 0,01, \*\*\*: p < 0,001, nd = não detectável.

O mecanismo de ação dos inibidores de BRAF e de MEK não se restringe ao bloqueio da via MAPK e consequente, morte das células tumorais. Estes inibidores também possuem um papel importante sobre o sistema imune. E este trabalho visou a modulação de IDO (uma enzima que possui funções reguladoras no sistema imune) após tratamento com inibidor de BRAF ou inibidor de MEK.

O mecanismo de ação reguladora de IDO no sistema imune envolve tanto depleção de triptofano (que inibirá a proliferação dos linfócitos T e promoverá a diferenciação de Tregs) quanto a produção da quinurenina (que promoverá também a diferenciação de Tregs levando as células dendríticas e macrófagos a um fenótipo imunossupressivo) (MUNN e MELLOR, 2016). Diante destas informações, é possível inferir que as linhagens WM164 parental e resistente não conseguiriam modular o sistema imune, visto que, embora a IDO estivesse presente, ela não estava funcionalmente ativa, pois não houve depleção do triptofano, tampouco produção de quinurenina.

Além disso, os resultados mostraram que a regulação de IDO, após adição do inibidor de BRAF, é heterogênea. Entretanto, notou-se que a maioria das linhagens parentais (SK-MEL-28, A375, SK-MEL-19 e SK-MEL-29) apresentou uma diminuição de IDO. A única linhagem parental que apresentou um comportamento oposto (com aumento de IDO) foi a WM164. Entretanto, como discutido anteriormente, a IDO da linhagem WM164 não estava funcionalmente ativa.

Para as linhagens resistentes (SK-MEL-28, A375, WM164), o comportamento foi homogêneo: a expressão de IDO não se alterou após a adição do inibidor de BRAF. Este resultado também não surpreende, pois, os pacientes se tornam resistentes à terapia por não responderem mais ao tratamento – e traçando um paralelo com as linhagens, o comportamento é similar – ou seja, não há mais modulação de IDO (seja positiva ou negativa) – ao contrário de suas respectivas linhagens parentais.

Em relação às linhagens BRAF selvagem; embora não se possa determinar um padrão de resposta (foram analisadas três linhagens e cada uma respondeu de uma maneira), foi possível ver que a modulação de IDO não se dá pelo inibidor de BRAF ou pela mutação BRAFV600E, mas pela inibição da via MAPK. Ao utilizar o inibidor de MEK, bloqueou-se a via em uma proteína abaixo e esse bloqueio também foi capaz de regular a expressão de IDO.

O mecanismo molecular pelo qual IDO é diminuída (SK-MEL-28 P, A375 P e SK-MEL-173) passa pela fosforilação de STAT1. Enquanto os níveis totais de STAT1 permanecem inalterados, a pSTAT1 também é diminuída. A via JAK-STAT é a via canônica para indução de IDO pelo IFN- $\gamma$ , portanto, há uma comunicação entre as duas vias. Entretanto, o aumento de IDO (WM164 e SK-MEL-103) não foi acompanhado pelo aumento de pSTAT, sendo que este permaneceu inalterado – ou seja, o aumento de IDO pelo bloqueio da via MAPK ocorre por outros mecanismos moleculares.

HENNEQUART et al. (2017) realizou um experimento semelhante para analisar a modulação de IDO após adição de iBRAf e iMEK. A diferença é que ele usou apenas uma linhagem de melanoma com mutação BRAFV600E que expressava IDO constitutivamente, ou seja, ele não utilizou o IFN- $\gamma$  ou algum outro indutor. E o resultado foi de que IDO diminuiu após o bloqueio de MAPK – mesmo tipo de resposta obtida neste trabalho. O estudo dele verificou que a expressão constitutiva de IDO é devido a expressão de ciclooxigenase-2 e indiretamente, a via MAPK controla a expressão de IDO.

Estes resultados somados a literatura mostram a abrangência da atuação destas terapias direcionadas sobre outros campos, como a imunologia.

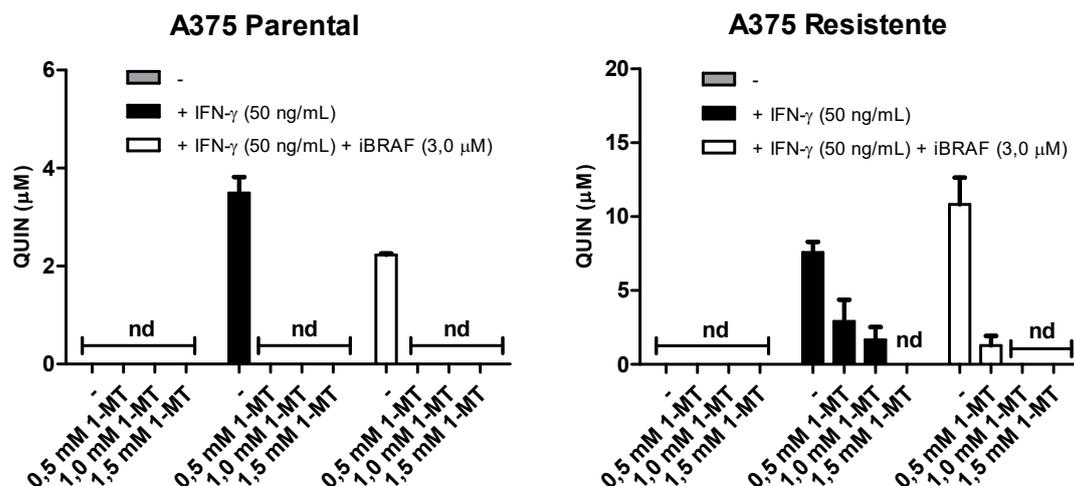
É válido ressaltar que, para as condições utilizadas nestes ensaios (figura 22 a 25), foi avaliada a viabilidade celular frente aos tratamentos e os resultados se encontram no item 5.8.1., figura 30 e tabela 2.

#### **5.6. Ensaio de atividade de IDO: tratamento 1-MT**

A fim de verificar a IDO como potencial alvo farmacológico, utilizamos um inibidor de IDO, o 1-metil-triptofano (1-MT) para verificar a inibição de IDO. Nestes experimentos, foi utilizado a mistura racêmica do produto em três diferentes concentrações: 0,5, 1,0 e 1,5 mM. As linhagens selecionadas para o tratamento com o inibidor de IDO foi a A375 e SK-MEL-28 parental e resistente. Como a linhagem WM164 não apresentava a IDO funcionalmente ativa, não seria justificável selecionar esta linhagem.

Na linhagem A375 parental, a concentração mínima utilizada de 0,5 mM de 1-MT foi suficiente para inibir toda a atividade enzimática de IDO, tendo os níveis de quinurenina não detectáveis (figura 26, gráfico a esquerda).

**Figura 26.** Concentração de quinurenina na linhagem parental e resistente da A375 após tratamento com 1-MT



Fonte: autoria própria

Legenda: concentração de quinurenina na linhagem A375 parental (a esquerda) e resistente (a direita) após tratamento com diferentes concentrações de 1-MT (0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mM). Grupo cinza: grupo controle, grupo preto: tratamento com IFN- $\gamma$  (50 ng/mL), grupo branco: tratamento com IFN- $\gamma$  (50 ng/mL) + iBRAF (3,0  $\mu\text{M}$ ). QUIN: quinurenina, nd = não detectável. As barras representam o erro padrão de três experimentos independentes.

Já na linhagem A375 resistente, é possível observar que a concentração de quinurenina foi decrescente conforme o aumento na concentração do 1-MT, sendo que na maior concentração utilizada de 1,5 mM, a quinurenina não estava mais presente, mostrando a total inibição de IDO. Além disso, foi possível observar uma sinergia entre 1-MT e o iBRAF (figura 26, gráfico a direita, grupo branco). A concentração de quinurenina neste grupo foi menor quando comparada com o grupo que não recebeu iBRAF (grupo preto) e a partir da concentração de 1,0 mM, já não havia mais presença de quinurenina. O interessante é comparar o controle do grupo preto (adição de IFN- $\gamma$ ) com o grupo branco (adição de IFN- $\gamma$  e iBRAF) – ao adicionar o iBRAF, houve aumento de quinurenina, porém, ao se adicionar o 1-MT, houve diminuição da quinurenina.

A análise estatística *Two-way Anova* mostrou que o efeito da concentração de 1-MT foi significativa ( $p < 0,0001$ ) tanto na linhagem A375 parental quanto na resistente.

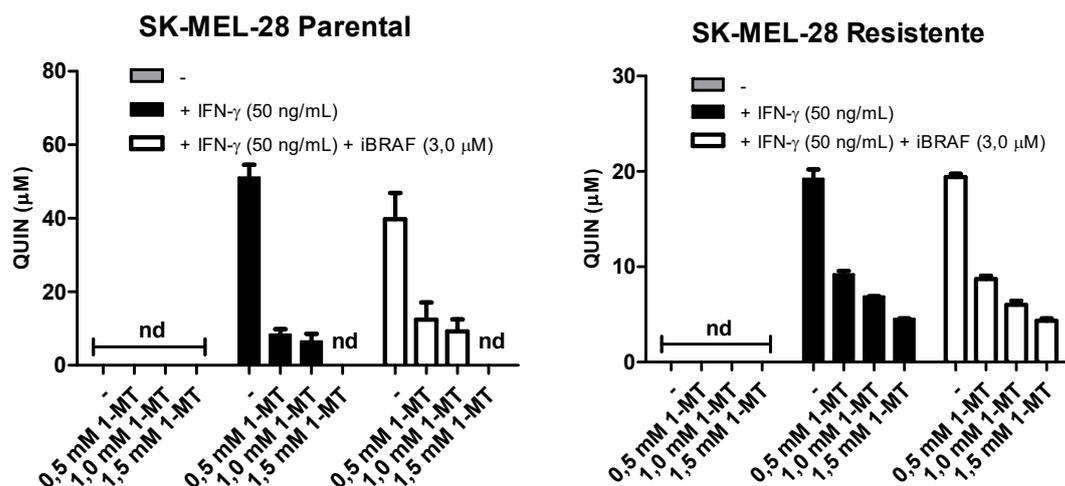
Na linhagem SK-MEL-28 parental, a diminuição de quinurenina também ocorreu conforme o aumento de 1-MT, embora, as concentrações de quinurenina tenham sido próximas nas concentrações de 0,5 e 1,0 mM de 1-MT (figura 27, gráfico a esquerda, grupo preto). Além disso, a adição de iBRAF (grupo branco),

aumentou a concentração de quinurenina, mas não fora estatisticamente significativa. Além disso, a concentração de 1,5 mM de 1-MT foi suficiente para inibir totalmente a IDO, visto que os níveis de quinurenina não foram detectáveis.

Já a linhagem SK-MEL-28 resistente se mostrou menos sensível ao 1-MT, pois, a maior concentração utilizada de 1,5 mM não foi capaz de inibir totalmente a atividade de IDO. Ademais, a presença do iBRAF tampouco alterou a atividade de IDO, visto que os níveis de quinurenina, permaneceram praticamente os mesmos. Dentre as linhagens investigadas, esta se mostrou a mais resistente ao tratamento com o inibidor de IDO, 1-MT.

Da mesma maneira que a linhagem A375, a análise estatística *Two-way Anova* mostrou que o efeito da concentração de 1-MT foi significativa ( $p < 0,0001$ ) tanto na linhagem SK-MEL-28 parental quanto na resistente.

**Figura 27.** Concentração de quinurenina na linhagem parental e resistente da SK-MEL-28 após tratamento com 1-MT



Fonte: autoria própria

Legenda: concentração de quinurenina na linhagem SK-MEL-28 parental (a esquerda) e resistente (a direita) após tratamento com diferentes concentrações de 1-MT (0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mM). Grupo cinza: grupo controle, grupo preto: tratamento com IFN-γ (50 ng/mL), grupo branco: tratamento com IFN-γ (50 ng/mL) + iBRAF (3,0 µM). QUIN: quinurenina, nd = não detectável. As barras representam o erro padrão de três experimentos independentes.

A inibição de IDO vem sendo utilizado como estratégia para restabelecer o sistema imune na batalha contra as células tumorais. Um dos primeiros inibidores descritos foi o 1-metil-DLtriptofano e ele é um inibidor competitivo da IDO, se ligando no sítio catalítico da enzima, sendo que provavelmente, a forma levógira (-L), o inibidor predominante (CADY e SONO, 1991). Outros estudos também demonstraram que a forma levógira possui maior capacidade de

inibição da atividade enzimática de IDO (HOU et al., 2007 e LÖB et al., 2009). Entretanto, a forma dextrógira (-D) do 1-metil-triptofano (1-D-MT), mostrou-se possui maior atividade antitumoral em modelos animais, sendo mais eficaz em reverter a supressão de linfócitos T mediada por células dendríticas IDO positivas, e, portanto, tem sido a isoforma selecionada para estudos clínicos em humanos (HOU et al., 2007). Além disso, outros estudos mostraram que atividade antitumoral do 1-D-MT não se deve a inibição da atividade catalítica de IDO, mas por outros mecanismos que são complexos e ainda não foram completamente elucidados. (LÖB et al., 2009; PRENDERGAST et al., 2017 e PALLOTTA et al., 2018).

Embora a forma 1-D-MT esteja sendo usada nos ensaios clínicos, é importante, destacar a importância da forma 1-L-MT, pois, segundo literatura, é a forma responsável por inibir a atividade enzimática de IDO, impedindo a depleção do triptofano e produção de quinurenina.

É válido ressaltar que, para as condições utilizadas nestes ensaios (figura 26 e 27), foi avaliada a viabilidade celular frente aos tratamentos e os resultados se encontram no item 5.8.2., figuras 31 e 32, e tabelas 3 e 4.

### **5.7. Ensaio clonogênico com 1-MT**

O ensaio clonogênico baseia-se na capacidade de uma única célula crescer até formar uma colônia, ou seja, a partir de um único clone; e teve por objetivo avaliar o efeito direto do 1-MT nas células tumorais de formarem colônias a longo prazo.

As linhagens selecionadas foram as mesmas do experimento anterior, para verificação da atividade enzimática, após inibição pelo 1-MT, através da quantificação de quinurenina, A375 e SK-MEL-28 parental e resistente.

Neste ensaio, além das diferentes concentrações de 1-MT (0,0; 0,5 e 1,5 mM), foram utilizados dois grupos distintos: ausência e presença do IFN- $\gamma$ . O grupo sem a presença de IFN- $\gamma$  irá mostrar os efeitos do 1-MT além da sua capacidade de inibir IDO. Como o IFN- $\gamma$ , um indutor de IDO, estará ausente no meio, as células não produzirão IDO e a resposta obtida não poderá ser atribuída à inibição de IDO.

Os resultados se encontram nas figuras 28 (linhagem A375) e 29 (linhagem SK-MEL-28). A análise estatística *Two-way Anova* mostrou que o

efeito da concentração de 1-MT foi significativa ( $p < 0,0001$ ) para as quatro linhagens estudadas e em todas elas é possível ver uma dose-dependência.

Uma diferença entre as linhagens A375 e SK-MEL-28 é a resposta frente ao IFN- $\gamma$ . Na linhagem A375 R, a presença de IFN- $\gamma$  não alterou o número de colônias. Já na linhagem A375 P, há uma redução no número de colônias quando o IFN- $\gamma$  é adicionado ( $p < 0,05$ ), porém, a redução é inferior quando comparada as linhagens SK-MEL-28 parental e resistente ( $p < 0,0001$ ).

Ao analisar os grupos na ausência de IFN- $\gamma$ , percebe-se o efeito do 1-MT, além da sua capacidade primária de inibir a IDO. Ou seja, o 1-MT também possui efeito na capacidade proliferativa das células, reduzindo-a conforme o aumento da concentração. OPTIZ et al. (2011) descreveu que a forma dextrógira (-D) do 1-MT possuía a era capaz de modular a expressão gênica em células tumorais e inclusive aumentar a expressão de IDO. Além disso, LÖB et al. (2009) também demonstrou em seu trabalho que o 1-D-MT não possuía a capacidade de inibir a IDO. E que o efeito terapêutico deste isômero não pode ser atribuído à inibição de IDO.

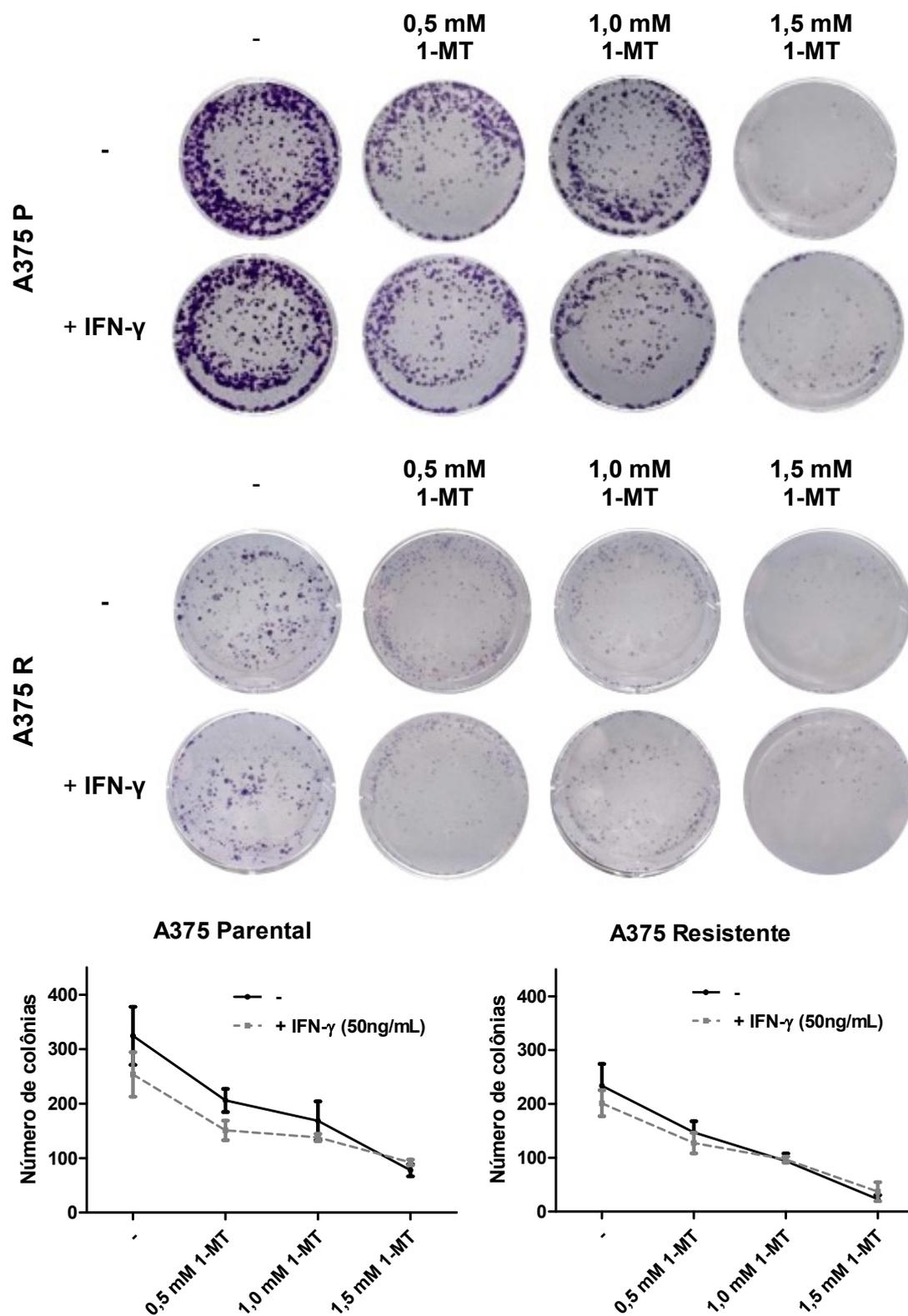
Portanto, de acordo com a literatura, é provável que o efeito do 1-MT exerceu na capacidade de formação de colônias ocorreu devido a forma dextrógira (-D) do 1-metil-triptofano.

O efeito antitumoral do 1-D-MT se mostra complexo e ainda não foi completamente elucidado. Um dos mecanismos de ação pode estar relacionado a biossíntese de melatonina por estas células tumorais (MORENO et al., 2013). Além disso, o 1-D-MT pode restaurar a atividade de mTOR (inibida pela depleção de triptofano), atenuando o processo autofágico (METZ et al., 2012).

Desta maneira, é possível observar uma maneira de atuação mais abrangente do 1-MT. Além disso, a literatura mostra que cada isômero possui atividades distintas – enquanto que o 1-L-MT possui maior capacidade de inibir a atividade enzimática de IDO, o 1-D-MT possui maior capacidade antitumoral ao reverter a supressão de células T. (HOU et al., 2007, LÖB et al., 2009; PRENDERGAST et al., 2017).

Neste trabalho, ao se utilizar a mistura racêmica, pode-se observar ambas atividades – tanto na inibição da IDO ao se bloquear a produção de quinurenina quanto na capacidade antiproliferativa a longo prazo no ensaio clonogênico. Portanto, a mistura racêmica não pode ser desconsiderada para futuros ensaios.

**Figura 28.** Potencial de inibição na formação de colônias do 1-MT na linhagem A375 parental e resistente

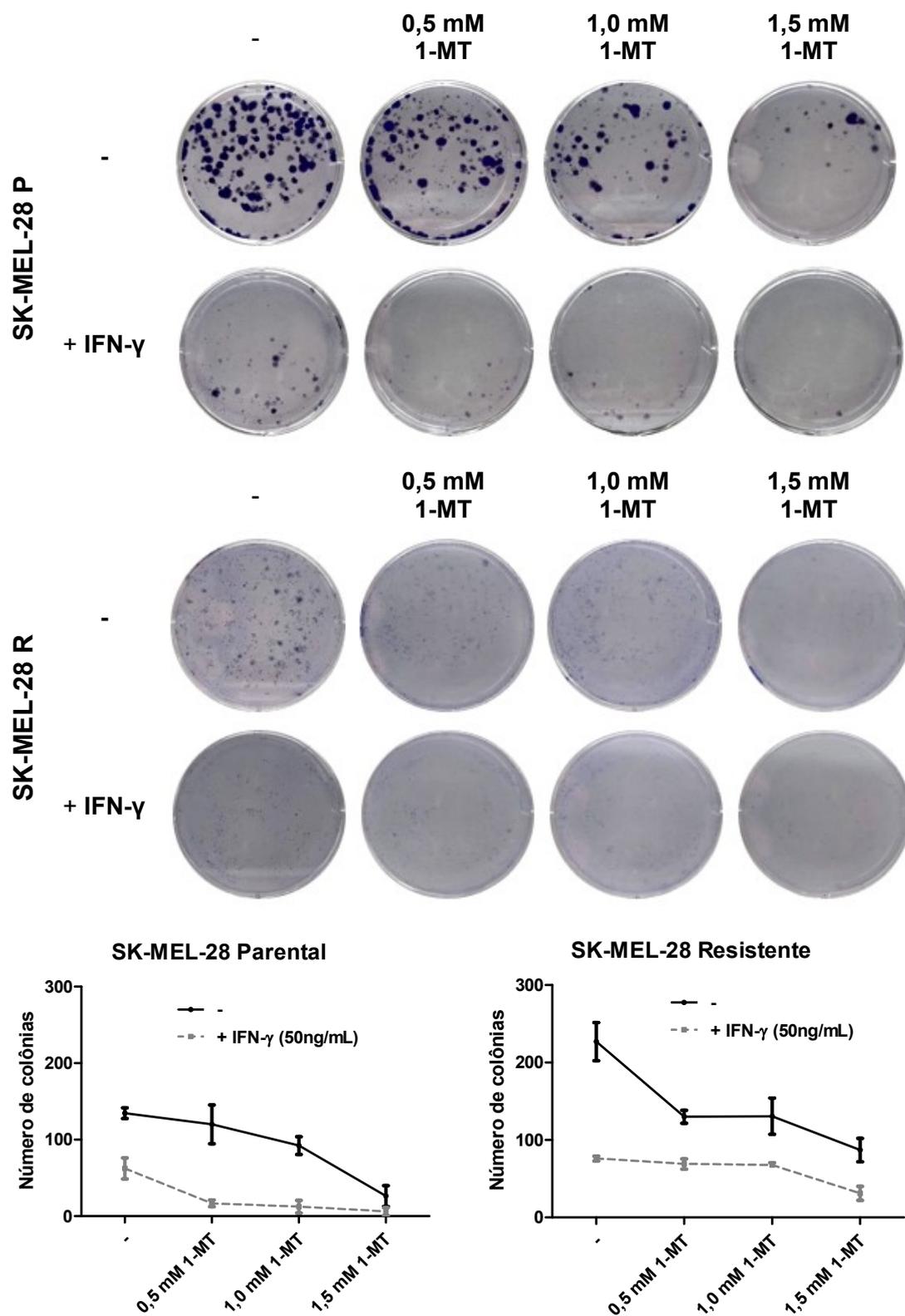


Fonte e legenda: vide verso

Fonte: autoria própria.

Legenda: linhagens utilizadas: A375 parental (P) e resistente (R). Colônias formadas após tratamento com diferentes concentrações de 1-MT (0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mM) com ou sem IFN- $\gamma$  (50 ng/mL). As células foram plaqueadas (600 células por poço) e após 24h (para aderência), iniciou-se o tratamento com 1-MT (na presença e ausência de IFN- $\gamma$ ) – o meio junto com o tratamento era substituído a cada 3-4 dias. Após 7 dias, as colônias formadas foram fixadas e coradas com cristal violeta. As imagens são representativas de três experimentos independentes. A quantificação do número de colônias foi realizada com o software Image J. As barras representam o erro padrão de três experimentos independentes.

**Figura 29.** Potencial de inibição na formação de colônias do 1-MT na linhagem SK-MEL-28 parental e resistente



Fonte e legenda: vide verso

Fonte: autoria própria.

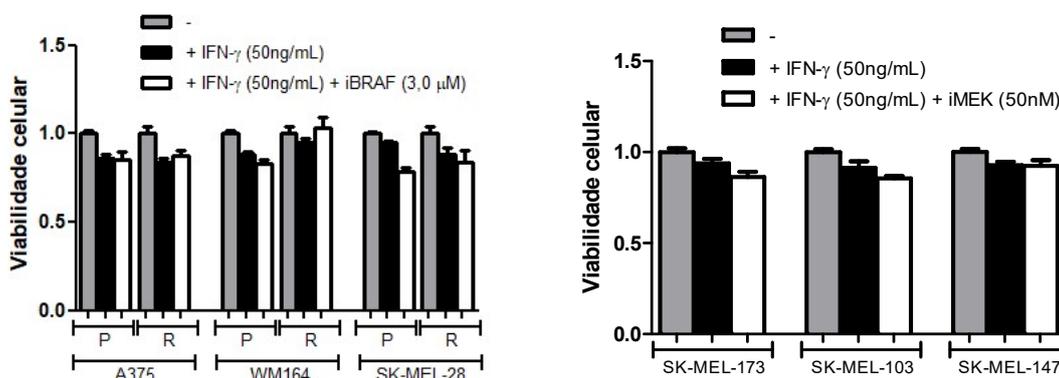
Legenda: linhagens utilizadas: SK-MEL-28 parental (P) e resistente (R). Colônias formadas após tratamento com diferentes concentrações de 1-MT (0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mM) com ou sem IFN- $\gamma$  (50 ng/mL). As células foram plaqueadas (600 células por poço) e após 24h (para aderência), iniciou-se o tratamento com 1-MT (na presença e ausência de IFN- $\gamma$ ) – o meio junto com o tratamento era substituído a cada 3-4 dias. Após 7 dias, as colônias formadas foram fixadas e coradas com cristal violeta. As imagens são representativas de três experimentos independentes. A quantificação do número de colônias foi realizada com o software Image J. As barras representam o erro padrão de três experimentos independentes.

## 5.8. Ensaio de viabilidade celular: MTT

### 5.8.1. Tratamento com IFN- $\gamma$ , iBRAF e iMEK

Com o objetivo de verificar a viabilidade celular frente aos regimes de tratamento utilizados na análise de expressão proteica e na análise de atividade de IDO, foi realizado o ensaio de MTT e os resultados se apresentam conforme figura 30 e tabela 2.

**Figura 30.** Viabilidade celular frente aos diferentes regimes de tratamento adotados



Fonte: autoria própria

Legenda: Gráfico à esquerda: viabilidade celular das linhagens A375, WM164 e SK-MEL-28, parental (P) e resistente (R). Grupo cinza: grupo controle, grupo preto: tratamento com IFN- $\gamma$  (50 ng/mL), grupo branco: tratamento com IFN- $\gamma$  (50 ng/mL) + iBRAF (3,0  $\mu$ M). O tempo de tratamento foi de 24h. Gráfico à direita: viabilidade celular das linhagens SK-MEL-173, SK-MEL-103 e SK-MEL-147. Grupo cinza: grupo controle, grupo preto: tratamento com IFN- $\gamma$  (50 ng/mL), grupo branco: tratamento com IFN- $\gamma$  (50 ng/mL) + iMEK (50 nM). O tempo de tratamento foi de 24h. As barras representam o erro padrão de três experimentos independentes.

A tabela 2 contém os valores correspondentes à figura 30. Para as linhagens contendo a mutação BRAF (A375, WM164 e SK-MEL-28), nos grupos onde somente o IFN- $\gamma$  foi adicionado a viabilidade celular variou de 0,84 (A375 resistente) a 0,95 (WM164 R e SK-MEL-28 P). Já nos grupos onde foram adicionados IFN- $\gamma$  e o inibidor de BRAF, a viabilidade celular variou de 0,79 (SK-MEL-28 P) a 1,04 (WM164 R).

Para as linhagens sem a mutação BRAF (SK-MEL-173, SK-MEL-103 e SK-MEL-147), nos grupos onde somente o IFN- $\gamma$  foi adicionado a viabilidade celular variou de 0,91 (SK-MEL-103) a 0,94 (SK-MEL-173). Já nos grupos onde foram adicionados IFN- $\gamma$  e o inibidor de MEK, a viabilidade celular variou de 0,86

(SK-MEL-173 e 103) a 0,92 (SK-MEL-147). Estes resultados mostram que as concentrações utilizadas não foram tóxicas.

**Tabela 2.** Viabilidade celular frente aos diferentes regimes de tratamento adotados das linhagens com a mutação BRAFV600E

Linhagem	-	+ IFN- $\gamma$	+ IFN- $\gamma$ + iBRAF ou iMEK
<b>A375 P</b>	1,00 $\pm$ 0,05	0,86 $\pm$ 0,05	0,85 $\pm$ 0,12
<b>A375 R</b>	1,00 $\pm$ 0,11	0,84 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,07
<b>WM164 P</b>	1,00 $\pm$ 0,05	0,89 $\pm$ 0,04	0,83 $\pm$ 0,06
<b>WM164 R</b>	1,00 $\pm$ 0,11	0,95 $\pm$ 0,06	1,04 $\pm$ 0,15
<b>SK-MEL-28 P</b>	1,00 $\pm$ 0,04	0,95 $\pm$ 0,03	0,79 $\pm$ 0,06
<b>SK-MEL-28 R</b>	1,00 $\pm$ 0,11	0,88 $\pm$ 0,12	0,84 $\pm$ 0,19
<b>SK-MEL-173</b>	1,00 $\pm$ 0,06	0,94 $\pm$ 0,07	0,86 $\pm$ 0,08
<b>SK-MEL-103</b>	1,00 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,10	0,86 $\pm$ 0,04
<b>SK-MEL-147</b>	1,00 $\pm$ 0,05	0,93 $\pm$ 0,05	0,92 $\pm$ 0,09

Fonte: autoria própria

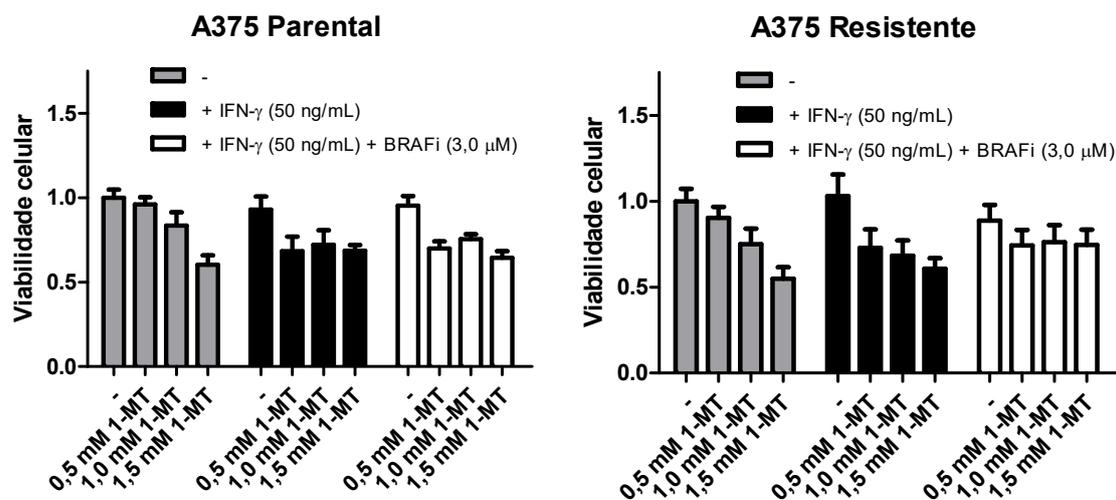
Legenda: viabilidade celular das linhagens A375, WM164 e SK-MEL-28, parental (P) e resistente (R), SK-MEL-173, SK-MEL-103 e SK-MEL-147 em diferentes tratamentos: (-) grupo controle, ausência de tratamentos, (+IFN- $\gamma$ ) adição de 50 ng/mL de IFN- $\gamma$ , (+IFN- $\gamma$  +iBRAF ou +iMEK): adição de 50 ng/mL de IFN- $\gamma$  e 3,0  $\mu$ M de iBRAF ou 50 nM de iMEK). Os valores representam a média e o respectivo desvio padrão.

### 5.8.2. Tratamento com 1-MT

Com o objetivo de verificar a viabilidade celular frente às diferentes concentrações de 1-MT utilizados, foi realizado o ensaio de MTT e os resultados se apresentam conforme figuras 31 e 32 e tabelas 3 e 4.

A tabela 3 contém os valores correspondentes à figura 31. Para a linhagem A375 P, o grupo controle (figura 31, gráfico a esquerda, grupo cinza) teve a viabilidade variando de 0,60 (1,5 mM de 1-MT) a 0,96 (0,5 mM de 1-MT). Já o grupo com adição de IFN- $\gamma$  (figura 31, gráfico a esquerda, grupo preto), a viabilidade celular frente ao 1-MT foi praticamente a mesma nas três concentrações, variando de 0,68 a 0,72. O mesmo ocorreu no grupo com IFN- $\gamma$  e iBRAF (figura 31, gráfico a esquerda, grupo branco) – a viabilidade variou de 0,64 a 0,75.

**Figura 31.** Viabilidade celular da linhagem A375 parental e resistente em diferentes concentrações do 1-MT



Fonte: autoria própria

Legenda: viabilidade celular da linhagem A375 parental (a esquerda) e resistente (a direita) em diferentes concentrações de 1-MT (0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mM). Grupo cinza: grupo controle, grupo preto: tratamento com IFN- $\gamma$  (50 ng/mL), grupo branco: tratamento com IFN- $\gamma$  (50 ng/mL) + iBRAF (3,0  $\mu$ M). As barras representam o erro padrão de três experimentos independentes.

Já a linhagem A375 R, o grupo controle (figura 31, gráfico a direita, grupo cinza) teve a viabilidade variando de 0,53 (1,5 mM de 1-MT) a 0,88 (0,5 mM de 1-MT). Já o grupo com adição de IFN- $\gamma$  (figura 31, gráfico a direita, grupo preto), a viabilidade celular frente ao 1-MT variou de 0,55 (1,5 mM) a 0,71 (0,5 mM). Já o grupo com adição de IFN- $\gamma$  e iBRAF (figura 31, gráfico a direita, grupo branco), a viabilidade celular frente ao 1-MT foi praticamente a mesma nas três concentrações, variando de 0,72 a 0,76.

**Tabela 3.** Viabilidade celular da linhagem A375 parental e resistente em diferentes concentrações do 1-MT e em diferentes condições

Linhagem (1)	A375 P			A375 R		
	(2) -	+ IFN- $\gamma$	+ IFN- $\gamma$ + iBRAF	-	+ IFN- $\gamma$	+ IFN- $\gamma$ + iBRAF
-	1,00 $\pm$ 0,11	0,93 $\pm$ 0,17	0,95 $\pm$ 0,13	1,00 $\pm$ 0,05	1,02 $\pm$ 0,18	0,89 $\pm$ 0,19
0,5 mM	0,96 $\pm$ 0,08	0,68 $\pm$ 0,19	0,70 $\pm$ 0,09	0,88 $\pm$ 0,05	0,71 $\pm$ 0,17	0,73 $\pm$ 0,14
1,0 mM	0,83 $\pm$ 0,18	0,72 $\pm$ 0,19	0,75 $\pm$ 0,07	0,72 $\pm$ 0,07	0,67 $\pm$ 0,14	0,76 $\pm$ 0,20
1,5 mM	0,60 $\pm$ 0,12	0,69 $\pm$ 0,06	0,64 $\pm$ 0,09	0,53 $\pm$ 0,07	0,55 $\pm$ 0,09	0,72 $\pm$ 0,14

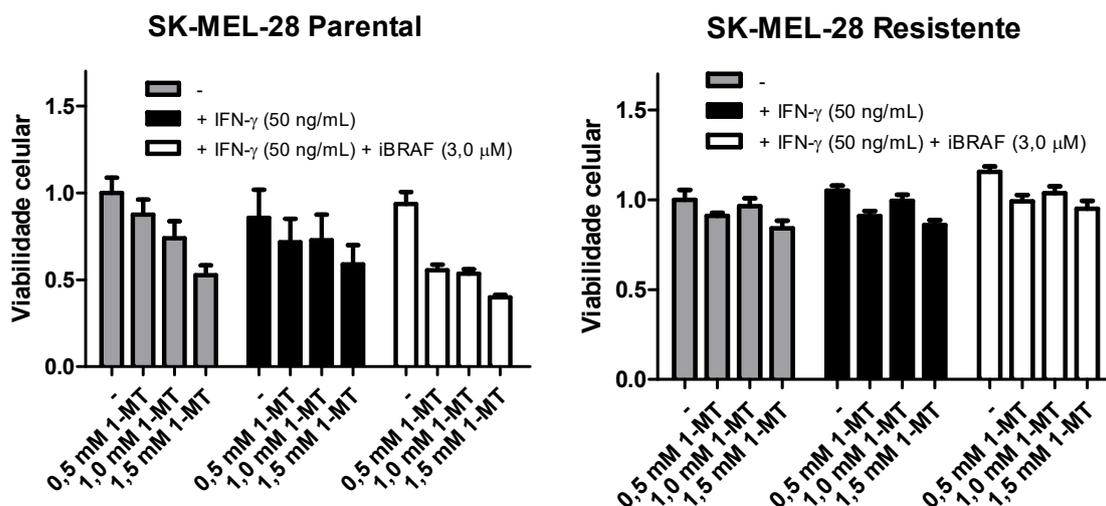
Fonte e legenda: vide verso

Fonte: autoria própria

Legenda: Viabilidade celular da linhagem A375 parental e resistente em (1) três condições distintas: (-) grupo controle, ausência de tratamentos, (+IFN- $\gamma$ ) adição de 50 ng/mL de IFN- $\gamma$ , (+IFN- $\gamma$  +iBRAF): adição de 50 ng/mL de IFN- $\gamma$  e 3,0  $\mu$ M de iBRAF e em (2) diferentes concentrações de 1-MT: (-) grupo controle, ausência de 1-MT, 0,5; 1,0 e 1,5 mM. Os valores representam a média e o respectivo desvio padrão.

A tabela 4 contém os valores correspondentes à figura 32. Para a linhagem SK-MEL-28 P, o grupo controle (figura 32, gráfico a esquerda, grupo cinza) teve a viabilidade variando de 0,53 (1,5 mM de 1-MT) a 0,80 (0,5 mM de 1-MT). Já o grupo com adição de IFN- $\gamma$  (figura 32, gráfico a esquerda, grupo preto), a viabilidade celular variou de 0,42 (1,5 mM de 1-MT) a 0,73 (1,0 mM de 1-MT). E para o grupo com adição de IFN- $\gamma$  e iBRAF (figura 32, gráfico a esquerda, grupo branco) – a viabilidade variou de 0,40 (1,5 mM de 1-MT) a 0,55 (0,5 mM de 1-MT).

**Figura 32.** Viabilidade celular da linhagem SK-MEL-28 parental e resistente em diferentes concentrações do 1-MT



Fonte: autoria própria

Legenda: Viabilidade celular da linhagem SK-MEL-28 parental (a esquerda) e resistente (a direita) em diferentes concentrações de 1-MT (0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mM). Grupo cinza: grupo controle, grupo preto: tratamento com IFN- $\gamma$  (50 ng/mL), grupo branco: tratamento com IFN- $\gamma$  (50 ng/mL) + iBRAF (3,0  $\mu$ M). As barras representam o erro padrão de três experimentos independentes.

Já a linhagem SK-MEL-28 R, o grupo controle (figura 32, gráfico a direita, grupo cinza) teve a viabilidade variando de 0,84 (1,5 mM de 1-MT) a 0,96 (1,0 mM de 1-MT). Já o grupo com adição de IFN- $\gamma$  (figura 32, gráfico a direita, grupo preto), a viabilidade celular frente ao 1-MT variou de 0,86 (1,5 mM) a 0,99 (1,0 mM). Já o grupo com adição de IFN- $\gamma$  e iBRAF (figura 32, gráfico a direita, grupo branco), a viabilidade celular frente ao 1-MT variou de 0,95 (1,5 mM) a 1,04 (1,0 mM).

**Tabela 4.** Viabilidade celular da linhagem SK-MEL-28 parental e resistente em diferentes concentrações do 1-MT e em diferentes condições

Linhagem	SK-MEL-28 P			SK-MEL-28 R		
	(1) (2)	-	+ IFN- $\gamma$	+ IFN- $\gamma$ + iBRAF	-	+ IFN- $\gamma$
-	1,00 $\pm$ 0,19	0,86 $\pm$ 0,17	0,94 $\pm$ 0,16	1,00 $\pm$ 0,12	1,05 $\pm$ 0,07	1,16 $\pm$ 0,06
<b>0,5 mM</b>	0,80 $\pm$ 0,22	0,72 $\pm$ 0,27	0,55 $\pm$ 0,07	0,91 $\pm$ 0,04	0,91 $\pm$ 0,06	0,99 $\pm$ 0,08
<b>1,0 mM</b>	0,74 $\pm$ 0,22	0,73 $\pm$ 0,30	0,54 $\pm$ 0,05	0,96 $\pm$ 0,10	0,99 $\pm$ 0,08	1,04 $\pm$ 0,09
<b>1,5 mM</b>	0,53 $\pm$ 0,13	0,42 $\pm$ 0,24	0,40 $\pm$ 0,03	0,84 $\pm$ 0,10	0,86 $\pm$ 0,06	0,95 $\pm$ 0,10

Fonte: autoria própria

Legenda: Viabilidade celular da linhagem SK-MEL-28 parental e resistente em (1) três condições distintas: (-) grupo controle, ausência de tratamentos, (+IFN- $\gamma$ ) adição de 50 ng/mL de IFN- $\gamma$ , (+IFN- $\gamma$  +iBRAF): adição de 50 ng/mL de IFN- $\gamma$  e 3,0  $\mu$ M de iBRAF; e em (2) diferentes concentrações de 1-MT: (-) grupo controle, ausência de 1-MT; 0,5; 1,0 e 1,5 mM. Os valores representam a média e o respectivo desvio padrão.

## 6. Conclusões

Este trabalho teve como objetivo investigar a expressão de IDO no melanoma humano, tanto na progressão da doença – do nevo à metástase – quanto na sua modulação frente à inibição da via MAPK em linhagens parentais e resistentes ao iBRAF. Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- A expressão de IDO é crescente nas células do microambiente tumoral, conforme a progressão do melanoma. A análise *in silico* e a imunohistoquímica em amostras de pacientes mostraram maior expressão de IDO nos estágios mais avançados da doença.
- A análise *in silico* mostrou que a expressão gênica de IDO está positiva e diferencialmente expressa na fase de resistência ao iBRAF quando comparada a fase pré-tratamento.
- A inibição da via MAPK, tanto por inibidor de BRAF quanto por inibidor de MEK, em linhagens contendo ou não a mutação BRAFV600E conseguiu regular a expressão de IDO, sendo que a maioria das linhagens mostrou uma regulação negativa de IDO após inibição da via MAPK.
- O inibidor de IDO, 1-MT, conseguiu inibir a atividade catalítica de IDO, impedindo a produção de quinurenina. Além disso, mostrou uma atividade antitumoral mais abrangente ao exercer um efeito antiproliferativo a longo prazo de maneira dose-dependente em linhagens parentais e resistentes ao iBRAF.

Deste modo, é possível concluir que a IDO se apresenta como um possível marcador da progressão da doença. Além disso, o seu monitoramento poderia prever se o paciente será responsivo ou não a um tratamento com um inibidor de IDO. Além disso, os resultados mostraram que os inibidores de BRAF e MEK possuem uma atuação mais abrangente – além de inibirem a via MAPK (via responsável pela proliferação e sobrevivência da célula), eles conseguem modular o sistema imune através da regulação de IDO. Além disso, não se pode descartar a IDO como alvo farmacológico, apesar do insucesso com o epacadostat, e tampouco pode-se descartar o 1-MT como candidato a nova terapia contra o melanoma, pois, além de inibir a IDO, ele exerce um efeito antiproliferativo direto nas células tumorais.

## Referências bibliográficas

ASCIERTO, P. A.; FLAHERTY, K.; GOFF, S. Emerging Strategies in Systemic Therapy for the Treatment of Melanoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, n. 38, p. 751-758, May 2018. ISSN 1548-8756. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30231371> >.

ASCIERTO, P. A. et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med*, v. 10, p. 85, Jul 2012. ISSN 1479-5876. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22554099> >.

BALACHANDRAN, V. P. et al. Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido. *Nat Med*, v. 17, n. 9, p. 1094-100, Aug 2011. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21873989> >.

BALL, H. J. et al. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene*, v. 396, n. 1, p. 203-13, Jul 2007. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17499941> >.

BOYLAND, E.; WILLIAMS, D. C. The metabolism of tryptophan. 2. The metabolism of tryptophan in patients suffering from cancer of the bladder. *Biochem J*, v. 64, n. 3, p. 578-82, Nov 1956. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13373811> >.

BRODY, J. R. et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival. *Cell Cycle*, v. 8, n. 12, p. 1930-4, Jun 2009. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19448397> >.

BUCHBINDER, E. I.; DESAI, A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*, v. 39, n. 1, p. 98-106, Feb 2016. ISSN 1537-453X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26558876> >.

CADY, S. G.; SONO, M. 1-Methyl-DL-tryptophan, beta-(3-benzofuranyl)-DL-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and beta-[3-benzo(b)thienyl]-DL-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indoleamine 2,3-dioxygenase. *Arch Biochem Biophys*, v. 291, n. 2, p. 326-33, Dec 1991. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1952947> >.

CANTOR, J. R.; SABATINI, D. M. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov*, v. 2, n. 10, p. 881-98, Oct 2012. ISSN 2159-8290. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23009760> >.

CHAPMAN, P. B. et al. Vemurafenib in patients with BRAFV600 mutation-positive metastatic melanoma: final overall survival results of the randomized BRIM-3 study. *Ann Oncol*, v. 28, n. 10, p. 2581-2587, Oct 2017. ISSN 1569-8041. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28961848> >.

CHEVOLET, I. et al. Peritumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression in melanoma: an early marker of resistance to immune control? *Br J Dermatol*, v. 171, n. 5, p. 987-95, Nov 2014. ISSN 1365-2133. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24814041> >.

COOPER, Z. A. et al. BRAF inhibition is associated with increased clonality in tumor-infiltrating lymphocytes. *Oncoimmunology*, v. 2, n. 10, p. e26615, Oct 2013. ISSN 2162-4011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24251082> >.

DE JONG, W. H. et al. Plasma tryptophan, kynurenine and 3-hydroxykynurenine measurement using automated on-line solid-phase extraction HPLC-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, v. 877, n. 7, p. 603-9, Mar 2009. ISSN 1873-376X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19196554> >.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, v. 21, n. 2, p. 137-48, Aug 2004. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15308095> >.

FIDLER, B. IDO Don'ts: After Immunotherapy Failure, Experts Say Slow Down. *Xconomy*, 31 mai 2018. Disponível em: <<https://xconomy.com/national/2018/05/31/ido-donts-after-immunotherapy-failure-experts-say-slow-down/>>. Acesso em: 21 de setembro de 2018.

FONG, L.; SMALL, E. J. Anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 antibody: the first in an emerging class of immunomodulatory antibodies for cancer treatment. *J Clin Oncol*, v. 26, n. 32, p. 5275-83, Nov 2008. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18838703> >.

FOX, E. et al. Indoximod: An Immunometabolic Adjuvant That Empowers T Cell Activity in Cancer. *Front Oncol*, v. 8, p. 370, 2018. ISSN 2234-943X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30254983> >.

FREDERICK, D. T. et al. BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*, v. 19, n. 5, p. 1225-31, Mar 2013. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23307859> >.

FUJIGAKI, H.; SEISHIMA, M.; SAITO, K. Posttranslational modification of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Anal Bioanal Chem*, v. 403, n. 7, p. 1777-82, Jun 2012. ISSN 1618-2650. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22460077> >.

FUJIMOTO, M. et al. Melanocytic tumors with intraepidermal melanophages: a report of five cases with review of 231 archived cutaneous melanocytic tumors. *J Cutan Pathol*, v. 42, n. 6, p. 394-9, Jun 2015. ISSN 1600-0560. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25733008> >.

GAJEWSKI, T. F.; SCHREIBER, H.; FU, Y. X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*, v. 14, n. 10, p. 1014-22, Oct 2013. ISSN 1529-2916. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24048123>>.

GARBER, K. A promising new cancer drug has hit a major setback, raising questions about whether the field is moving too fast. *Science*, 09 mai 2018. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/news/2018/05/promising-new-cancer-drug-has-hit-major-setback-raising-questions-about-whether-field>>. Acesso em: 21 de setembro de 2018.

GIDE, T. N. et al. Inter- and intra-patient heterogeneity of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in primary and metastatic melanoma cells and the tumor microenvironment. *Histopathology*, Dec 2018. ISSN 1365-2559. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30589949>>.

GOLDINGER, S. M. et al. Targeted therapy in melanoma - the role of BRAF, RAS and KIT mutations. *EJC Suppl*, v. 11, n. 2, p. 92-6, Sep 2013. ISSN 1359-6349. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26217117>>.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*, v. 445, n. 7130, p. 851-7, Feb 2007. ISSN 1476-4687. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17314971>>.

HASCITHA, J. et al. Analysis of Kynurenine/Tryptophan ratio and expression of IDO1 and 2 mRNA in tumour tissue of cervical cancer patients. *Clin Biochem*, v. 49, n. 12, p. 919-24, Aug 2016. ISSN 1873-2933. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27106797>>.

HENNEQUART, M. et al. Constitutive IDO1 Expression in Human Tumors Is Driven by Cyclooxygenase-2 and Mediates Intrinsic Immune Resistance. *Cancer Immunol Res*, v. 5, n. 8, p. 695-709, 08 2017. ISSN 2326-6074. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28765120>>.

HODI, F. S. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, v. 363, n. 8, p. 711-23, Aug 2010. ISSN 1533-4406. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20525992>>.

HOLMGAARD, R. B. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. *J Exp Med*, v. 210, n. 7, p. 1389-402, Jul 2013. ISSN 1540-9538. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23752227>>.

HORNYÁK, L. et al. The Role of Indoleamine-2,3-Dioxygenase in Cancer Development, Diagnostics, and Therapy. *Front Immunol*, v. 9, p. 151, 2018. ISSN 1664-3224. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29445380>>.

HOU, D. Y. et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer Res*, v. 67, n. 2, p. 792-801, Jan 2007. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17234791> >.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. 2016. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>> Acesso em: 15 de agosto de 2016.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. 2018. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/>> Acesso em: 10 de março de 2019.

INO, K. et al. Inverse correlation between tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with disease progression and survival. *Clin Cancer Res*, v. 14, n. 8, p. 2310-7, Apr 2008. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18413819> >.

JANG, S.; ATKINS, M. B. Treatment of BRAF-mutant melanoma: the role of vemurafenib and other therapies. *Clin Pharmacol Ther*, v. 95, n. 1, p. 24-31, Jan 2014. ISSN 1532-6535. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24080641> >.

KAKADIA, S. et al. Mechanisms of resistance to BRAF and MEK inhibitors and clinical update of US Food and Drug Administration-approved targeted therapy in advanced melanoma. *Onco Targets Ther*, v. 11, p. 7095-7107, 2018. ISSN 1178-6930. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30410366> >.

KHALILI, J. S.; HWU, P.; LIZÉE, G. Forging a link between oncogenic signaling and immunosuppression in melanoma. *Oncoimmunology*, v. 2, n. 2, p. e22745, Feb 2013. ISSN 2162-4011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23525189> >.

KIM, R.; EMI, M.; TANABE, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, v. 121, n. 1, p. 1-14, May 2007. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17386080> >.

KOMIYA, T.; HUANG, C. H. Updates in the Clinical Development of Epacadostat and Other Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Inhibitors (IDO1) for Human Cancers. *Front Oncol*, v. 8, p. 423, 2018. ISSN 2234-943X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30338242> >.

KONG, X. et al. Cancer drug addiction is relayed by an ERK2-dependent phenotype switch. *Nature*, v. 550, n. 7675, p. 270-274, 10 2017. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28976960> >.

KRÄHENBÜHL, L. et al. A Longitudinal Analysis of IDO and PDL1 Expression during Immune- or Targeted Therapy in Advanced Melanoma. *Neoplasia*, v. 20, n. 2, p. 218-225, 02 2018. ISSN 1476-5586. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29331888> >.

KUDCHADKAR, R. R. et al. Targeted therapy in melanoma. *Clin Dermatol*, v. 31, n. 2, p. 200-8, 2013 Mar-Apr 2013. ISSN 1879-1131. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23438383> >.

LEE, G. K. et al. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology*, v. 107, n. 4, p. 452-60, Dec 2002. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12460190> >.

LEE, J. R. et al. Pattern of recruitment of immunoregulatory antigen-presenting cells in malignant melanoma. *Lab Invest*, v. 83, n. 10, p. 1457-66, Oct 2003. ISSN 0023-6837. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14563947> >.

LEE, R. J.; MARAIS, R. Cancer: Tumours addicted to drugs are vulnerable. *Nature*, v. 550, n. 7675, p. 192-193, 10 2017. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28976969> >.

LEPPANEN, V. V.; OKA, M. Metabolism of tryptophan in cancer of various sites. *Ann Med Exp Biol Fenn*, v. 41, p. 123-37, 1963. ISSN 0003-4479. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13929800> >.

LÖB, S. et al. IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. *Cancer Immunol Immunother*, v. 58, n. 1, p. 153-7, Jan 2009. ISSN 1432-0851. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18418598> >.

MATTIA, G. et al. Cell death-based treatments of melanoma: conventional treatments and new therapeutic strategies. *Cell Death Dis*, v. 9, n. 2, p. 112, Jan 2018. ISSN 2041-4889. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371600> >.

MERLINO, G. et al. The state of melanoma: challenges and opportunities. *Pigment Cell Melanoma Res*, v. 29, n. 4, p. 404-16, 07 2016. ISSN 1755-148X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27087480> >.

METZ, R. et al. IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. *Oncoimmunology*, v. 1, n. 9, p. 1460-1468, Dec 2012. ISSN 2162-4011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23264892> >.

MILLET, A. et al. Metastatic Melanoma: Insights Into the Evolution of the Treatments and Future Challenges. *Med Res Rev*, v. 37, n. 1, p. 98-148, 01 2017. ISSN 1098-1128. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27569556> >.

MITTAL, D. et al. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*, v. 27, p. 16-25, Apr 2014. ISSN 1879-0372. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24531241> >.

MOON, Y. W. et al. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *J Immunother Cancer*, v. 3, p. 51, 2015. ISSN 2051-1426. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26674411> >.

MORENO, A. C. et al. The expanding roles of 1-methyl-tryptophan (1-MT): in addition to inhibiting kynurenine production, 1-MT activates the synthesis of melatonin in skin cells. *FEBS J*, v. 280, n. 19, p. 4782-92, Oct 2013. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23879623> >.

MULLER, A. J.; SCHERLE, P. A. Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Nat Rev Cancer*, v. 6, n. 8, p. 613-25, Aug 2006. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16862192> >.

MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest*, v. 117, n. 5, p. 1147-54, May 2007. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17476344> >.

MUNN, D. H.; MELLOR, A. IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends Immunol*, v. 37, n. 3, p. 193-207, Mar 2016. ISSN 1471-4981. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26839260> >.

NELP, M. T. et al. Immune-modulating enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase is effectively inhibited by targeting its apo-form. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 115, n. 13, p. 3249-3254, 03 2018. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29531094> >.

NIKOLAOU, V. A. et al. Melanoma: new insights and new therapies. *J Invest Dermatol*, v. 132, n. 3 Pt 2, p. 854-63, Mar 2012. ISSN 1523-1747. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22217739> >.

NOBEL PRIZE. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2018. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2018/summary>> Acesso em: 10 de março de 2019.

OPITZ, C. A. et al. The indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibitor 1-methyl-D-tryptophan upregulates IDO1 in human cancer cells. *PLoS One*, v. 6, n. 5, p. e19823, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21625531> >.

OTT, P. A.; HODI, F. S.; ROBERT, C. CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients. *Clin Cancer Res*, v. 19, n. 19, p. 5300-9, Oct 2013. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24089443> >.

PALLOTTA, M. T. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol*, v. 12, n. 9, p. 870-8, Jul 2011. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21804557> >.

PELSTER, M. S.; AMARIA, R. N. Combined targeted therapy and immunotherapy in melanoma: a review of the impact on the tumor microenvironment and outcomes of early clinical trials. *Ther Adv Med Oncol*, v. 11, p. 1-11, 2019. ISSN 1758-8340. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30815041> >.

PLATANIAS, L. C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*, v. 5, n. 5, p. 375-86, May 2005. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15864272> >.

POSTOW, M. A.; CALLAHAN, M. K.; WOLCHOK, J. D. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol*, v. 33, n. 17, p. 1974-82, Jun 2015. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25605845> >.

PRENDERGAST, G. C. et al. Discovery of IDO1 Inhibitors: From Bench to Bedside. *Cancer Res*, v. 77, n. 24, p. 6795-6811, 12 2017. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29247038> >.

RUBEL, F. et al. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression in Primary Cutaneous Melanoma Correlates with Breslow Thickness and Is of Significant Prognostic Value for Progression-Free Survival. *J Invest Dermatol*, v. 138, n. 3, p. 679-687, 03 2018. ISSN 1523-1747. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29054599> >.

SAPKOTA, B.; HILL, C. E.; POLLACK, B. P. Vemurafenib enhances MHC induction in BRAF. *Oncoimmunology*, v. 2, n. 1, p. e22890, Jan 2013. ISSN 2162-4011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23483066> >.

SATYAMOORTHY, K.; HERLYN, M. Cellular and molecular biology of human melanoma. *Cancer Biol Ther*, v. 1, n. 1, p. 14-7, 2002 Jan-Feb 2002. ISSN 1538-4047. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12170758> >.

SCHADENDORF, D. et al. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol*, v. 33, n. 17, p. 1889-94, Jun 2015. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25667295> >.

SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*, v. 16, n. 6, p. 345-58, 06 2016. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27125352> >.

SHARMA, M. D. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. *Blood*, v. 113, n. 24, p. 6102-11, Jun 2009. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366986> >.

SLIPICEVIC, A.; HERLYN, M. Narrowing the knowledge gaps for melanoma. *Ups J Med Sci*, v. 117, n. 2, p. 237-43, May 2012. ISSN 2000-1967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22339359> >.

SPEECKAERT, R. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase, a new prognostic marker in sentinel lymph nodes of melanoma patients. *Eur J Cancer*, v. 48, n. 13, p. 2004-11, Sep 2012. ISSN 1879-0852. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22033321> >.

SWANN, J. B.; SMYTH, M. J. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest*, v. 117, n. 5, p. 1137-46, May 2007. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17476343> >.

TAS, F. Metastatic behavior in melanoma: timing, pattern, survival, and influencing factors. *J Oncol*, v. 2012, p. 647684, 2012. ISSN 1687-8469. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22792102> >.

TOPALIAN, S. L. et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*, v. 366, n. 26, p. 2443-54, Jun 2012. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22658127> >.

UYTTENHOVE, C. et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*, v. 9, n. 10, p. 1269-74, Oct 2003. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14502282> >.

VAZQUEZ, V. E. L. et al. Melanoma characteristics in Brazil: demographics, treatment, and survival analysis. *BMC Res Notes*, v. 8, p. 4, Jan 2015. ISSN 1756-0500. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25592837> >.

WEINLICH, G. et al. Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients. *Dermatology*, v. 214, n. 1, p. 8-14, 2007. ISSN 1018-8665. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17191041> >.

WHIPPLE, C. A.; BRINCKERHOFF, C. E. BRAF(V600E) melanoma cells secrete factors that activate stromal fibroblasts and enhance tumourigenicity. *Br J Cancer*, v. 111, n. 8, p. 1625-33, Oct 2014. ISSN 1532-1827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25117819> >.

WILMOTT, J. S. et al. Dynamics of chemokine, cytokine, and growth factor serum levels in BRAF-mutant melanoma patients during BRAF inhibitor treatment. *J Immunol*, v. 192, n. 5, p. 2505-13, Mar 2014. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24489105> >.

WILMOTT, J. S. et al. Selective BRAF inhibitors induce marked T-cell infiltration into human metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*, v. 18, n. 5, p. 1386-94, Mar 2012. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22156613> >.

YAJIMA, I. et al. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy. *Dermatol Res Pract*, v. 2012, p. 354191, 2012. ISSN 1687-6113. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22013435> >.

YASUI, H. et al. Interferon enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase: its possible occurrence in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 83, n. 17, p. 6622-6, Sep 1986. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2428037> >.

ZAKHARIA, Y. et al. Phase 2 trial of the IDO pathway inhibitor indoximod plus checkpoint inhibition for the treatment of patients with advanced melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, v. 36, n. 15\_suppl, p. 9512-9512, 2018. Disponível em: < [https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2018.36.15\\_suppl.9512](https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.9512) >.

ZBYTEK, B. et al. Current concepts of metastasis in melanoma. *Expert Rev Dermatol*, v. 3, n. 5, p. 569-585, Oct 2008. ISSN 1746-9872. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19649148> >.

ZHANG, W. BRAF inhibitors: the current and the future. *Curr Opin Pharmacol*, v. 23, p. 68-73, Aug 2015. ISSN 1471-4973. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26072431> >.

**APÊNDICE A.** *Script* para análise de expressão gênica de IDO na progressão do melanoma através do gráfico tipo *boxplot* utilizando a linguagem de programação 'R'

Este *script* foi utilizado para geração do gráfico da figura 8 e possui os mesmos comandos para a geração do gráfico da figura 9. As únicas diferenças são em relação a peculiaridade de cada banco de dados utilizado. Por exemplo.: o estudo 'GSE12391' categorizou a progressão do melanoma em 5 estágios a partir do nevo e o estudo 'GSE46517' categorizou em 4 estágios a partir da pele normal.

```
library(GEOquery)
library(ggplot2)
library(ggsignif)

#leitura dos pacotes necessários#

gse12391 <- getGEO('GSE12391',GSEMatrix=T)

#download do GSE12391 diretamente do website do NCBI#

eset <- gse12391[[1]]
mtx1 <- assayDataElement(eset,'exprs')

#criação da matrix onde cada linha corresponde a um gene e cada coluna a
uma amostra de paciente e o valor da célula é o valor de expressão gênica do
gene/paciente correspondente#

annotGene <- eset@featureData@data[["GENE_SYMBOL"]]
rownames(mtx1) <- annotGene

#inclusão dos genes no nome das linhas#

annotSample <- eset@phenoData@data[["title"]]
colnames(mtx1) <- annotSample

#inclusão do tipo de amostra (nevo, melanoma...) no nome das colunas#

df1 <- matrix(nrow = ncol(mtx1), ncol = 3)
df1[,1] <- colnames(mtx1)
df1[,3] <- mtx1[["INDO",]
colnames(df1) <- c("SampleID","Estágio", "IDO1")

df1[grep("common", df1[, "SampleID"]), "Estágio"] <- "Nevo comum"
df1[grep("dysplastic", df1[, "SampleID"]), "Estágio"] <- "Nevo displásico"
df1[grep("vertical", df1[, "SampleID"]), "Estágio"] <- "Melanoma VGP"
df1[grep("radial", df1[, "SampleID"]), "Estágio"] <- "Melanoma RGP"
df1[grep("metas", df1[, "SampleID"]), "Estágio"] <- "Metástase de melanoma"
```

```
#classificação das amostras conforme o seu tipo. Ex.: onde houver a palavra
# 'common' na coluna 'SampleID' da matrix 'mtx2', a coluna 'Estágio' será #
#preenchida com "Nevo comum"##
```

```
df1 <- as.data.frame(df1)
```

```
df1$Estágio <- factor(df1$Estágio, levels=c("Nevo comum",
                                           "Nevo displásico",
                                           "Melanoma RGP",
                                           "Melanoma VGP",
                                           "Metástase de melanoma"))
```

```
df1 <- df1[order(df1$Estágio),]
```

```
#criação de 5 fatores (do nevo comum à metástase de melanoma ordenando
as linhas pelos 5 fatores"
```

```
df1$IDO1 <- as.numeric(levels(df1$IDO1))[df1$IDO1]
```

```
my_comparisons <- list( c("Nevo comum", "Melanoma VGP"),
                        c("Nevo displásico", "Melanoma VGP"),
                        c("Nevo comum", "Metástase de melanoma"),
                        c("Nevo displásico", "Metástase de melanoma"))
```

```
anova1 <- aov(df1$IDO1 ~ df1$Estágio)
TukeyHSD(anova1)
```

```
#lista das comparações que serão realizadas no One-Way Anova, seguido pelo
teste comparativo de Tukey#
```

```
graph <- ggplot(as.data.frame(df1), aes_string(x="Estágio", y="IDO1" ,
fill="Estágio")) +
  geom_boxplot(outlier.shape = NA) +
  ylim(min(df1$IDO1), max(df1$IDO1)*2) +
  geom_jitter(position=position_jitter(0.05)) +
  theme(axis.line = element_line(linetype = "solid"),
        axis.ticks = element_line(colour = "black", size = 1),
        panel.grid.major = element_line(colour = NA, linetype = "blank"),
        panel.grid.minor = element_line(colour = NA, linetype = "blank"),
        panel.background = element_rect(fill = NA, colour = "black", size = 1,
linetype = "solid")) +
  ggtitle("GSE12391 - Expressão gênica de IDO do nevo à metástase de
melanoma")+
  labs(y= "Expressão Gênica", x = NULL) +
  geom_signif(comparisons = my_comparisons, map_signif_level=TRUE,
y_position = c(1.2, 1.1, 1.4, 1.3))
```

```
graph
```

**APÊNDICE B.** *Script* para análise de genes diferencialmente expressos entre linhagens parental e resistente ao iBRAF através do gráfico tipo *volcano plot* utilizando a linguagem de programação 'R'

Este *script* foi utilizado para geração do gráfico da figura 14 e possui os mesmos comandos para a geração dos gráficos da figura 15 e 16. As únicas diferenças são em relação a peculiaridade de cada banco de dados utilizado. Por exemplo.: o estudo 'GSE12391' categorizou a progressão do melanoma em 5 estágios a partir do nevo e o estudo 'GSE46517' categorizou em 4 estágios a partir da pele normal.

```
setwd("C:/Users/Luis/Documents/Dissertação/GSE68840") #estabelecendo
essa pasta como o diretório de trabalho#

df <- read.table("GSE68840_par_vs_res.txt",header=T,row.names=1)

#criação do dataframe a partir da importação do arquivo .txt que estava no
diretório do trabalho#

#este arquivo .txt foi baixado do site GEO do NCBI, utilizando a ferramenta
Analyze with GEO2R, onde foi comparado as amostras sensíveis e resistentes
ao iBRAF#

#o arquivo não contém o símbolo do gene, mas o código do GenBank
accession. Para se determinar os genes correspondentes de cada código, foi
necessário os comandos a seguir#

gse68840 <- getGEO('GSE68840',GSEMatrix=T) #download do GSE68840
diretamente do website do NCBI#

eset <- gse68840[[1]]
#é possível visualizar os metadados do estudo, incluindo os genes"

annotSYMBOL <- eset@featureData@data[["Symbol"]]
annotID <- eset@featureData@data[["RefSeq_ID"]]

dfA <- matrix(nrow = 29285, ncol = 2)
dfA[,1] <- annotSYMBOL
dfA[,2] <- annotID

#criação de uma matrix, onde a primeira coluna são os símbolos do gene e a
segunda coluna é o código do GenBank accession – ambas informações
extraídas dos metadados do estudo#
dfA[grep("^IDO", dfA[,1]), ] #NM_002164.4#
dfA[grep("^INDO", dfA[,1]), ] #NM_002164.3#
dfA[grep("^STAT1", dfA[,1]), ] #NM_007315.2 e NM_139266.1#
```

```
dfA[grep("^JAK1", dfA[,1]), ] #NM_002227.1#
dfA[grep("^JAK2", dfA[,1]), ] #NM_004972.2#
dfA[grep("^IFNGR1", dfA[,1]), ] #NM_000416.1#
dfA[grep("^IFNGR2", dfA[,1]), ] #NM_005534.2#
```

# a função grep() é semelhante ao Ctrl+L (MS Word em Português) – ou seja, ela buscou na coluna 1 onde havia o símbolo do gene (IDO1, STAT1 e todos listados acima). Após executar a função, ela retornou o código do GenBank accession (NM\_XXX) correspondente. #

```
which(df[, "GB_ACC"] == "NM_002164.3") #360
which(df[, "GB_ACC"] == "NM_002164.4") #652
#a função which() determina em qual linha está o gene IDO1#
```

```
which(df[, "GB_ACC"] == "NM_007315.2") #23034
which(df[, "GB_ACC"] == "NM_139266.1") #12091 18897
#a função which() determina em qual linha está o gene STAT1#
```

```
which(df[, "GB_ACC"] == "NM_002227.1") #20330
#a função which() determina em qual linha está o gene JAK1#
```

```
which(df[, "GB_ACC"] == "NM_004972.2") #2586
#a função which() determina em qual linha está o gene JAK2#
```

```
which(df[, "GB_ACC"] == "NM_000416.1") #28444
#a função which() determina em qual linha está o gene IFNGR1#
```

```
which(df[, "GB_ACC"] == "NM_005534.2") #10813
#a função which() determina em qual linha está o gene IFNGR2#
```

#com a informação da linha onde estão os genes, poderemos identificar estes genes no gráfico que iremos gerar#

```
Ps <- df[, "adj.P.Val"]
PsLow <- Ps < 0.05
```

```
logFC1 <- df[, "logFC"]
logFCUP <- logFC1 > 1.5
logFC11 <- df[, "logFC"]
logFCDOWN <- logFC11 < -1.5
```

```
Classification <- print(ifelse(PsLow & logFCUP, "UP" , ifelse(PsLow &
logFCDOWN, "DOWN", "notDEG")))
```

```
df_class <- cbind(df, Classification)
table1 <- table(df_class[, "Classification"])
table1
```

#os genes com fold change maior que 1,5 e com p ajustado menor que 0,05 foi considerado diferencialmente expresso positivamente (UP) e os genes com fold

change menor que 1,5 e com p ajustado menor que 0,05 foi considerado diferencialmente expresso negativamente (DOWN) e o restante não estava diferencialmente expresso (notDEG).#

#a função table() mostrou o seguinte resultado dos genes diferencialmente expressos: DOWN: 719, notDEG: 27591, UP: 975#

#a seguir, estão os comandos para a construção do gráfico do tipo volcano plot#

```
minusLog10P <- log10(df_class["adj.P.Val"])*-1
x <- df_class["logFC"]
y <- minusLog10P
```

#o eixo x será o valor do fold change em log na base 2, enquanto que eixo y será o valor de p ajustado em log na base 10 vezes -1#

```
vol_plot <- plot(x, y,
  col=ifelse(y > log10(0.05)*-1 & x > 1.5, "red", ifelse(y > log10(0.05)*-1
& x < -1.5, "blue", "gray")),
  xlab="log2 fold-change",
  ylab="-log10P",
  xlim=c(-7, 7),
  ylim=c(0, 12),
  main = "GSE68840 - Parental vs Resistant" )
```

```
abline(h=log10(0.05)*-1,col="black",lty=3)
```

```
abline(v= c(-1.5,1.5),
  col=c("black", "black"),
  lty=c(3,3)
)
```

```
points(x[360], y[360], col="black", pch=8) #IDO
points(x[652], y[652], col="black", pch=8) #IDO
points(x[23034], y[23034], col="black", pch=4) #STAT1
points(x[12091], y[12091], col="black", pch=4) #STAT1
points(x[18897], y[18897], col="black", pch=4) #STAT1
points(x[20330], y[20330], col="black", pch=0) #JAK1
points(x[20330], y[2586], col="black", pch=5) #JAK2
points(x[28444], y[28444], col="black", pch=24) #IFNGR1
points(x[10813], y[10813], col="black", pch=25) #IFNGR2
```

```
legend(5, 6, legend= c("DOWN","notDEG", "UP"),
  col=c("blue", "gray", "red"), pch=16, cex=0.6)
```

```
legend(-6.9, 10, legend= c("IDO1", "STAT1", "JAK1", "JAK2", "IFNGR1",
"IFNGR2"),
  col="black", pch= c(8,4,0,5,24,25), cex=0.6)
```



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
MARINGÁ



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** O receptor aril de hidrocarbonetos (AHR) em melanomas: associação com mutações BRAF, com a progressão da doença e identificação de ligantes.

**Pesquisador:** Marcia Edilaine Lopes Consolaro

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 91219218.9.0000.0104

**Instituição Proponente:** Núcleo/Incubadora Unitrabalho

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.759.738

#### **Apresentação do Projeto:**

Trata-se de projeto de pesquisa proposto por pesquisador vinculado à Universidade Estadual de Maringá.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:** O objetivo deste trabalho está baseado nas seguintes hipóteses: a primeira hipótese de que o receptor aril de hidrocarbonetos (AHR) pode estar associado as mutações NRAS e BRAF sendo esta última relacionada com a resistência ao Vermurafenib. De forma que, se células não resistentes mas mutadas apresentarem maior expressão de AHR como para as células resistentes, este receptor pode ser um possível marcador de resistência e uma questão futura no tratamento. A segunda hipótese é que o AHR pode ser uma marcador de transformação maligna em melanomas. E ainda que a triptamina e dimetilriptamina, responsáveis por atividades antitumorais possam estar relacionadas ao receptor AHR. De maneira que, se AHR deslocar a ação tumoral da quinurenina, variando o perfil para antiproliferativo, este receptor pode ser utilizado para estudos futuros como alvo terapêutico. **Objetivos Secundários:** 1. Avaliar os níveis basais de expressão de AHR em células de melanoma de linhagens mutadas para NRAS, BRAF, e BRAF resistentes ao Vemirafenib e em células que compõem a pele (melanócitos, fibroblastos e queratinócitos); 2. Verificar relação do receptor AHR em comparação a expressão da enzimaIDO e a progressão tumoral em um banco de amostras de pacientes que contém desde nevos normais,

**Endereço:** Av. Colombo, 5790, UEM-PPG, sala 4

**Bairro:** Jardim Universitário

**CEP:** 87.020-900

**UF:** PR

**Município:** MARINGÁ

**Telefone:** (44)3011-4597

**Fax:** (44)3011-4444

**E-mail:** copep@uem.br

Continuação do Parecer: 2.759.738

nevus displásicos, melanoma radial, melanoma vertical até melanomas metastáticos nestas amostras; 3. Avaliar o papel de AHR nos efeitos biológicos de metabólitos do triptofano sobre linhagem de melanoma SK-Mel-147 editadas geneticamente para este receptor: 3.1. Avaliar o papel da deleção de AHR em contato com os metabólitos de triptofano em células tumorais.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Avalia-se que os possíveis riscos a que estarão sujeitos os participantes da pesquisa serão suplantados pelos benefícios apontados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de projeto de pesquisa proposto por pesquisador vinculado à Universidade Estadual de Maringá, cujo o tema é: O receptor aril de hidrocarbonetos (AHR) em melanomas: associação com mutações BRAF, com a progressão da doença e identificação de ligantes. O aminoácido poliaromático triptofano, essencial em muitos processos fisiológicos, é metabolizado por três vias distintas: a via das quinureninas, a serotoninérgica e das aminas-traço. Um dos receptores dos metabólitos originados a partir do triptofano é o AHR (receptor aril de hidrocarbonetos), um importante receptor e fator de transcrição regulador de processos celulares. O AHR forma um heterodímero, capaz de ativar a transcrição de genes com sequências consenso regulatórias responsivas a hidrocarbonetos aromáticos. O AHR é bem caracterizado no câncer de mama, mas poucos estudos elucidam seu papel em melanomas. O melanoma é um dos tipos de câncer de pele mais letal com cerca de 6.000 novos casos anualmente. É um câncer geneticamente diverso e estas diferenças caracterizam os tipos de tumores e as diferentes terapêuticas abordadas. Resultados anteriores demonstraram o papel pró-tumoral e antitumoral dos derivados do triptofano em modelos de melanoma. O presente projeto está baseado nas hipóteses: (1) o AHR pode estar associado às mutações BRAF e NRAS em melanomas e assim poderia estar relacionado à resistência ao inibidor de BRAF, o fármaco Vemurafenib, (2) pode ser um marcador da transformação de nevus e indicativo de malignidade de melanomas e (3) alguns dos metabólitos do triptofano originados da via serotoninérgica e das aminas-traço que inibem a proliferação de células de melanomas seriam ligantes de AHR. Para testarmos estas hipóteses será medida a expressão do AHR numa coleção de linhagens mutadas em NRAS e BRAF e também em células BRAF tornadas resistentes ao Vemurafenib. Para o segundo objetivo, contamos com um banco de amostras de pacientes que contém desde nevus normais, nevus displásicos, melanoma radial, melanoma vertical até melanomas metastáticos. A expressão de AHR nessa coleção será comparada com a expressão da enzima IDO. Para identificar outros

**Endereço:** Av. Colombo, 5790, UEM-PPG, sala 4**Bairro:** Jardim Universitário**CEP:** 87.020-900**UF:** PR**Município:** MARINGÁ**Telefone:** (44)3011-4597**Fax:** (44)3011-4444**E-mail:** copep@uem.br



Continuação do Parecer: 2.759.738

ligantes do AHR, células serão geneticamente editadas para AHR em uma linhagem de melanoma responsiva aos metabólitos do triptofano. Estes objetivos atendem a busca de novos marcadores diagnósticos e prognósticos para o melanoma, assim como a possibilidade de proposta de nova terapêutica.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresenta Folha de Rosto devidamente preenchida e assinada pelo responsável institucional. O cronograma de execução é compatível com a proposta enviada. Descreve gastos sob a responsabilidade do pesquisador. O Termo de dispensa de Consentimento Livre e Esclarecido contempla as garantias mínimas preconizadas. Apresenta a autorização necessária.

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá é de parecer favorável à aprovação do protocolo de pesquisa apresentado.

#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

Face ao exposto e considerando a normativa ética vigente, este Comitê se manifesta pela aprovação do protocolo de pesquisa em tela.

#### **Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1093290.pdf	07/06/2018 12:18:33		Aceito
Outros	RESPOSTA.docx	07/06/2018 12:18:06	Marcia Edilaine Lopes Consolaro	Aceito
Outros	Autor2.pdf	07/06/2018 12:17:48	Marcia Edilaine Lopes Consolaro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	07/06/2018 12:10:55	Marcia Edilaine Lopes Consolaro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.docx	20/04/2018 13:05:11	Marcia Edilaine Lopes Consolaro	Aceito
Outros	Declaracao.jpg	20/04/2018 13:04:21	Marcia Edilaine Lopes Consolaro	Aceito
Folha de Rosto	FR.pdf	20/04/2018 12:59:57	Marcia Edilaine Lopes Consolaro	Aceito

**Endereço:** Av. Colombo, 5790, UEM-PPG, sala 4

**Bairro:** Jardim Universitário

**CEP:** 87.020-900

**UF:** PR

**Município:** MARINGÁ

**Telefone:** (44)3011-4597

**Fax:** (44)3011-4444

**E-mail:** copep@uem.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
MARINGÁ



Continuação do Parecer: 2.759.738

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MARINGÁ, 06 de Julho de 2018

---

**Assinado por:**  
**Ricardo Cesar Gardiolo**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Colombo, 5790, UEM-PPG, sala 4

**Bairro:** Jardim Universitário

**CEP:** 87.020-900

**UF:** PR

**Município:** MARINGÁ

**Telefone:** (44)3011-4597

**Fax:** (44)3011-4444

**E-mail:** copep@uem.br



## Luis Roberto Masao Watanabe

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1381067460035408>

Última atualização do currículo em 25/03/2019

Possui graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade de São Paulo(2012) e especialização em MBA em Gestão de Negócios pelo Fundação Instituto de Administração(2016). **(Texto gerado automaticamente pela aplicação CVLattes)**

### Identificação

<b>Nome</b>	Luis Roberto Masao Watanabe
<b>Nome em citações bibliográficas</b>	WATANABE, L. R. M.

### Endereço

### Formação acadêmica/titulação

<b>2017</b>	Mestrado em andamento em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP, FCF / USP, Brasil. Título: Indolamina 2,3 dioxigenase (IDO) em melanoma: regulação frente ao inibidor de BRAF e sua expressão na progressão da doença,Orientador:  Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler. Coorientador: Dra. Silvana Sandri. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
<b>2014 - 2016</b>	Especialização em MBA em Gestão de Negócios. (Carga Horária: 480h). Fundação Instituto de Administração, FIA, Brasil. Título: Impacto na imagem da indústria farmacêutica diante de um recall. Orientador: Profa. Maria Cecilia Guilherme Siffert Pereira Diniz.
<b>2005 - 2012</b>	Graduação em Farmácia e Bioquímica. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Impacto da resolução nº 39/2008 da ANVISA no período antecedente ao início de um estudo clínico no Brasil. Orientador: Profa. Dra. Silvia Regina Cavani Jorge Santos.

### Formação Complementar

<b>2016 - 2016</b>	III Curso de Inverno em Fisiopatologia e Análises Clínicas. (Carga horária: 42h). Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP, FCF / USP, Brasil.
<b>2016 - 2016</b>	Manipulação em Microscopia e Boas Práticas em Micropipetagem. (Carga horária: 5h). Faculdade de Medicina / USP, FM / USP, Brasil.

### Atuação Profissional

Fundação Butantan, FB\*, Brasil.

**Vínculo institucional**  
**2015 - 2016**

**Outras informações**

Vínculo: , Enquadramento Funcional: Analista de Garantia da Qualidade II, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

- Revisão e liberação de pastas de Registro de Produção do Lote; - Investigação de desvios e não-conformidades; - Gerenciamento de ações corretivas e preventivas - CAPAs; - Gerenciamento das análises de Controle de mudança; - Emissão, distribuição e encerramento de Log Books; - Acompanhamento em autoinspeções; - Relatório de tendência dos desvios de monitoramento; - Acompanhamento fabril das áreas de Formulação, Envase, Acondicionamento de vacinas e Processamento de Plasmas Hiperimunes (soros).

**Novartis Biociencias Sa, NOVARTIS, Brasil.**

**Vínculo institucional**  
**2011 - 2015**

**Outras informações**

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Analista de GMP - Garantia da Qualidade, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

>>Analista de GMP - Garantia da Qualidade ? Compliance ? 02/2014 ? 09/2015 - Investigação de desvios e não conformidades e elaboração de análises de riscos, - Aprovação de artes (cartuchos, bulas, rótulos e tiras), - Aprovação e liberação de lotes de Pesquisa Clínica e produtos comerciais, - Cadastro de materiais no SAP em relação aos itens de qualidade, - Superuser do SAP e do sistema de gerenciamento de qualidade (AQWA ? Trackwise): fornecimento de acesso aos usuários, treinamento e melhoria contínua, - Elaboração dos relatórios de substâncias controladas para ANVISA, VISA, Polícia Civil e Federal e Exército, - Recebimento, avaliação, registro dos produtos devolvidos relacionados à qualidade, incluindo gerenciamento das ações e análise crítica para possível recuperação, - Suporte no gerenciamento das ações de recolhimentos, stock-outs e outras exigências das autoridades sanitárias, - Realização de auditorias/inspeções internas em áreas com impacto BPF, - Revisão e manutenção de procedimentos atualizados. >>Analista de GMP Jr - Garantia da Qualidade ? Compliance ? 10/2011 ? 01/2014 - Recebimento, avaliação de criticidade e registro das reclamações técnicas do mercado, reclamações técnicas de outras filiais nos sistemas de reclamações, - Investigação das reclamações, preparação das respostas das investigações aos clientes, - Acompanhamento das ações propostas decorrentes das investigações e posterior verificação de eficácias das ações, - Superuser do sistema de gerenciamento de reclamações de produtos OTC: fornecimento de acesso aos usuários, registro de novos produtos no sistema e melhoria contínua, - Fornecer suporte técnico ao Serviço de Informações ao Cliente e para a Farmacovigilância, - Revisão e manutenção dos procedimentos atualizados.

**Vínculo institucional**  
**2010 - 2011**

**Outras informações**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiário - Farmacovigilância, Carga horária: 30, Regime: Dedicção exclusiva.

- Treinamento nos procedimentos locais, globais e legislações aplicáveis à área de Farmacovigilância, - Processamento de casos de eventos adversos para matriz e para autoridades sanitárias locais (CVS e ANVISA), - Auxílio nas tarefas administrativas do departamento, - Fornecer suporte técnico para outras áreas (Informações Médicas, Serviço de Informações ao Cliente, Assuntos Regulatórios e Pesquisa Clínica).

**Icon Pesquisas Clínicas, ICON Clinical, Brasil.**

**Vínculo institucional**  
**2008 - 2010**

**Outras informações**

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Assistente de Pesquisa Clínica, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Gestão dos estudos conduzidos no Brasil, Chile e Argentina. - Responsável por preparar documentos para submissão ética, - Responsável por acompanhar aprovações éticas junto aos centros, - Responsável por coletar documentos da fase inicial para iniciação do centro, - Prover assistência aos membros da equipe, - Manter os sistemas e arquivos dos estudos atualizados, - Preparar e distribuir materiais dos estudos para os centros, - Suporte à equipe regulatória na preparação dos dossiês para submissão à ANVISA, - Atividades administrativas (suporte no mapeamento de processos, criação da estrutura dos arquivos). (Alocado em Amgen Brasil Biofarmacêutica Ltda.)

**Quintiles, Q, Brasil.**

**Vínculo institucional**  
**2007 - 2008**

**Outras informações**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiário - Assistente de Pesquisa Clínica, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

- Gerenciamento dos documentos clínicos, - Preparar e distribuir materiais dos estudos para os centros, - Manter os sistemas e arquivos do estudo atualizados, - Preparar e enviar os relatórios de segurança para os CEPs, - Acompanhamento de submissão e aprovação de documentos do estudo, - Envio de CRFs para o gerenciamento de dados, - Prover assistência aos membros da equipe.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

**Vínculo institucional**  
**2007 - 2007**

**Outras informações**

Vínculo: Iniciação científica, Enquadramento Funcional: Estágio, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva.

Estudos quantitativos de relação entre estrutura química e atividade biológica, QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship), são amplamente utilizados no planejamento de novos candidatos a fármacos. Dentre os descritores estruturais mais empregados em QSAR, destaca-se o coeficiente de partição octanol-agua ( $P_{o,w}$ ). No que diz respeito ao planejamento de fármacos que atuam no sistema nervoso central (SNC), estudos indicam, entretanto, que o valor de  $P_{o,w}$  não apresenta boa correlação com o transporte através da barreira hematoencefálica. O presente projeto visa estudar a utilização de coeficiente de partição micela-água para avaliação da passagem de fármacos através da barreira hematoencefálica

## Projetos de pesquisa

**2017 - Atual**

Indolamina 2,3 dioxigenase (IDO) em melanoma: regulação frente ao inibidor de BRAF e sua expressão na progressão da doença

Descrição: Apesar dos grandes avanços obtidos com a imunoterapia, este é um assunto ainda emergente no tratamento do câncer e tem alguns aspectos inexplorados. Dentro deste tema, a enzima IDO vem despertando um grande interesse pela participação nos mecanismos de imunotolerância, imunoescape e progressão tumoral. A IDO é uma enzima induzível, principalmente por interferons tipo I e II, e responsável pelo consumo e depleção do triptofano, produzindo o metabólito bioativo quinurenina. Ela está presente em diversos tipos celulares, incluindo células do sistema imune e células tumorais, incluindo o melanoma. O seu mecanismo de ação é associado com a redução intratumoral de infiltrado de células T efetoras e com a diferenciação para células T reguladoras, suprimindo a resposta imune contra o tumor. O melanoma é um câncer de baixa incidência na população, porém altamente invasivo e metastático, levando o paciente a óbito em poucos meses. A via MAPK é a melhor elucidada em relação à progressão do melanoma em decorrência da elevada taxa de mutações oncogênicas e por isso, se tornou alvo para o desenvolvimento de terapias direcionadas, entre elas o medicamento vemurafenibe, um inibidor da mutação BRAFV600E. Altas taxas de respostas aos medicamentos vêm sendo alcançadas; entretanto, a maioria dos pacientes apresentam resistência ao tratamento após 6 a 9 meses. Além disso, estudos demonstraram que o vemurafenibe apresenta uma atuação mais abrangente, incluindo, um papel no sistema imune com aumento da infiltração de linfócitos no microambiente tumoral, porém, seus mecanismos ainda não foram elucidados. Assim, levantou-se a hipótese do vemurafenibe atuar sobre a enzima IDO e de que células resistentes ao vemurafenibe possam ter a proliferação diminuída diante de um inibidor de IDO (1-MT). No presente projeto, visamos avaliar o efeito do vemurafenibe, um inibidor específico da mutação BRAFV600E, na expressão e na atividade da enzima IDO, uma enzima envolvida no processo de evasão do sistema imune. Buscaremos entender seus mecanismos moleculares e linhagens resistentes serão tratadas com 1-MT, um inibidor de IDO a fim de se verificar a sua capacidade na redução da proliferação celular.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) .

**2007 - 2007**

Integrantes: Luis Roberto Masao Watanabe - Coordenador / Silvyta Stuchi Maria-Engler - Integrante / Silvana Sandri - Integrante.

Estudo do coeficiente de partição micela-água de fármacos e sua correlação com a passagem através da barreira hematoencefálica

Descrição: Iniciação científica - Estudos quantitativos de relação entre estrutura química e atividade biológica, QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship), são amplamente utilizados no planejamento de novos candidatos a fármacos. Dentre os descritores estruturais mais empregados em QSAR, destaca-se o coeficiente de partição octanol-agua ( $P_{o,w}$ ). No que diz respeito ao planejamento de fármacos que atuam no sistema nervoso central (SNC), estudos indicam, entretanto, que o valor de  $P_{o,w}$  não apresenta boa correlação com o transporte através da barreira hematoencefálica. O presente projeto visa estudar a utilização de coeficiente de partição micela-água para avaliação da passagem de

fármacos através da barreira hematoencefálica.  
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.  
Alunos envolvidos: Graduação: (2) .

Integrantes: Luis Roberto Masao Watanabe - Integrante / Carlota de Oliveira Rangel Yagui  
- Coordenador / Thiago Hardt Bueno de Souza - Integrante.

## Idiomas

**Inglês**  
**Espanhol**

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.  
Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

## Prêmios e títulos

**2018**  
**2007**

Melhor apresentação oral de Mestrado - VIII SIMPAC / III ISPAT, FCF / USP.  
Melhor Pôster na Área de Fármacos e Medicamentos - Categoria Iniciação Científica, 15a Reunião de Iniciação Científica/XII Semana Farmacêutica de Ciênc, FCF / USP.

## Produções

### Produção bibliográfica

### Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1.  **WATANABE, L. R. M.**; SOUZA, T. H. B. ; RANGEL-YAGUI, C. O. . Estudos de coeficiente de partição micela-água em diferentes sistemas tensoativos. In: XII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia - FCF/USP, 2007, São Paulo. Biofarma, 2007.

## Eventos

### Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. IV ABCF (Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas) Congress. Indoleamine 2 3-Dioxygenase (IDO) enzyme can contributes to the resistance of human melanoma naïve and resistant to BRAF inhibitor. 2018. (Congresso).
2. VIII SIMPAC / III ISPAT.Indoleamine 2 3-Dioxygenase (IDO) enzyme can contributes to the resistance of human melanoma naïve and resistant to BRAF inhibitor. 2018. (Simpósio).
3. X Simpósio de Pré-iniciação Científica / Colégio Dante Alighieri.Programa Cientista Aprendiz. 2018. (Simpósio).
4. LII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica (SUPFAB). 2017. (Simpósio).
5. VIII Workshop on Melanoma Models. 2017. (Simpósio).
6. VII SIMPAC / II ISPAT. 2016. (Simpósio).
7. XLI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica (SUPFAB). 2006. (Simpósio).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 27/03/2019 às 10:42:04

Imprimir currículo

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Documento sem validade oficial**  
**FICHA DO ALUNO**

---

**9142 - 5413775/1 - Luis Roberto Masao Watanabe**

**Email:** luis.watanabe@usp.br  
**Data de Nascimento:** 21/09/1985  
**Cédula de Identidade:** RG - 43.771.916-9 - SP  
**Local de Nascimento:** Estado de São Paulo  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Farmacêutico-Bioquímico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2012

---

**Curso:** Mestrado  
**Programa:** Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)  
**Área:** Fisiopatologia  
**Data de Matrícula:** 06/12/2016  
**Início da Contagem de Prazo:** 06/12/2016  
**Data Limite para o Depósito:** 06/06/2019  
**Orientador:** Prof(a). Dr(a). Silvy Stuchi Maria Engler - 06/12/2016 até o presente. Email: silvy@usp.br  
**Proficiência em Línguas:** Inglês, Aprovado em 06/12/2016  
**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 22/01/2018  
**Data do Depósito do Trabalho:**  
**Título do Trabalho:**  
**Data Máxima para Aprovação da Banca:**  
**Data de Aprovação da Banca:**  
**Data Máxima para Defesa:**  
**Data da Defesa:**  
**Resultado da Defesa:**  
**Histórico de Ocorrências:** Primeira Matrícula em 06/12/2016

---

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

**Última ocorrência:** Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2019

**Impresso em:** 25/03/2019 14:04:30



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Documento sem validade oficial**  
**FICHA DO ALUNO**

9142 - 5413775/1 - Luis Roberto Masao Watanabe

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5709-6/1	Biologia Molecular em Análises Clínicas (1)	03/10/2016	30/10/2016	60	4	90	A	N	Concluída
BMI5881-5/1	Regulação da Resposta Imune (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/03/2017	03/05/2017	120	8	100	A	N	Concluída
FBC5793-13/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	07/03/2017	19/06/2017	15	1	100	A	N	Concluída
MCM5880-3/5	Bioestatística I (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	14/03/2017	24/04/2017	90	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBC5805-1/1	Lógica e Filosofia da Ciência	28/03/2017	10/07/2017	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
BMF5887-1/2	Novas Tendências em Farmacologia (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/04/2017	07/05/2017	30	2	90	B	N	Concluída
BMH5774-1/1	Metabolismo da Célula Tumoral (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/04/2017	15/05/2017	60	4	100	A	N	Concluída
QBQ5717-5/1	Biologia Molecular da Transformação Maligna (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	23/06/2017	10/08/2017	210	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBC5775-2/1	Modelos de Melanoma	09/08/2017	15/08/2017	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5757-8/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	15/08/2017	27/11/2017	15	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5707-7/1	Biologia de Sistemas para Ciências da Vida	19/09/2017	11/12/2017	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5757-8/2	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	02/08/2018	14/11/2018	15	1	90	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
<b>Disciplinas:</b>	0	25	26
<b>Estágios:</b>			
<b>Total:</b>	0	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

**Observações:**

1) Disciplina(s) cursada(s) isoladamente e aceita(s) pelo(a) orientador(a) do(a) candidato(a).

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2019

Impresso em: 25/03/2019 14:04:30