Simone Cardozo Stone

PAPEL DO METABOLISMO DE TUMORES ASSOCIADOS
AO PAPILOMAVÍRUS HUMANO NA MODULAÇÃO DO
FENÓTIPO DE MACRÓFAGOS HUMANOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Imunologia do Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

São Paulo
2016

Simone Cardozo Stone

PAPEL DO METABOLISMO DE TUMORES ASSOCIADOS
AO PAPILOMAVÍRUS HUMANO NA MODULAÇÃO DO
FENÓTIPO DE MACRÓFAGOS HUMANOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Lepique

Versão original.

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Cardozo Stone, Simone

Papel do metabolismo de tumores associados ao
Papilomavírus Humano na modulação do fenótipo de
macrófagos humanos / Simone Cardozo Stone;
orientadora Ana Paula Lepique. -- São Paulo, 2016.
94 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Câncer cervical. 2. Papilomavírus humano. 3.
Macrófagos. 4. Imunomodulação. 5. Lactato. I.
Lepique, Ana Paula, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Simone Cardozo Stone

Título da Tese: Papel do metabolismo de tumores associados ao Papilomavírus Humano na modulação do fenótipo de macrófagos humanos

Orientador(a): Ana Paula Lepique

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 01 de outubro de 2013.

PARECER 1146/CEP

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, na reunião realizada no dia 25.09.2013, APROVOU o projeto intitulado: "*Papel do metabolismo de tumores associados ao Papilomavírus Humano na modulação do fenótipo de macrófagos humanos*" da pesquisadora **ANA PAULA LEPIQUE** e aluna **SIMONE CARDOZO STONE**.

Cabe aos Pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c. conforme modelo constante no site.icb.usp.br.

Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **25.09.2014**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof. Ana Paula Lepique, por ter acreditado no meu potencial e confiado em mim para o desenvolvimento desse projeto. Por todas as discussões científicas ao longo desses últimos anos, que me fizeram crescer tanto profissional como pessoalmente.

Ao Toni, por toda a paciência e compreensão, amor e carinho. Por me acompanhar em experimentos fora de hora e ajudar a organizar meus pensamentos. O seu apoio foi fundamental para a conclusão dessa etapa!

A minha família pelo apoio e amor incondicional. Principalmente agradeço a minha mãe, pelo exemplo de luta e perseverança, pelo investimento e confiança em mim.

Aos meus amigos de São Paulo, que tornaram a vida aqui mais leve e alegre. Principalmente a Joice, pelo apoio em todas as horas e distrações muito oportunas. Agradeço também a Aleida e ao Ildefonso, pelos ótimos momentos e viagens juntos.

Aos meus amigos de longa data, Jaque e Léo. A vida deu um jeito de nos reunir novamente na mesma cidade e nos proporcionar novas histórias!

Aos meus colegas de laboratório. Especialmente a Renata, tanto pelas discussões científicas e auxílios nos experimentos, quanto pela amizade, por sempre ter um tempinho para me ouvir! A Karla, por todas as discussões científicas e trocas de protocolos. E a Sandra, pelo excelente apoio técnico no preparo dos materiais necessários para o desenvolvimento desse projeto.

Ao pessoal do laboratório da Prof. Sonia Jancar, pela troca de experiência e conhecimento e pelo auxílio em experimentos.

A Dra. Luisa Villa e ao grupo INCT HPV, pelos ensinamentos e apoio financeiro.

Aos demais colegas do departamento. Por tornar o departamento um ambiente agradável, de troca de conhecimentos.

A todos os professores do departamento e da USP que contribuíram para ampliar o meu conhecimento.

Aos secretários do departamento, Maria Eni e João, pelo apoio nos assuntos acadêmicos.

Ao prof. Aldo Tonso por ter cedido o equipamento de dosagem de lactato e glicose, fundamental para este trabalho.

A técnica Camille Caldeira, do Instituto de Química, pelo excelente auxílio nos experimentos com o equipamento Seahorse. Também agradeço a Angela Castoldi e ao Vinicius de Oliveira, do laboratório do Prof. Niels, pelo auxílio na elaboração desses experimentos.

A FAPESP (projeto 2013/26856-9) pelo apoio financeiro.

E por último e não menos importante, a todas as doadoras que colaboraram com esse projeto. Sem vocês, a realização desse projeto não seria possível!

RESUMO

STONE, S. C. **Papel do metabolismo de tumores associados ao Papilomavírus Humano na modulação do fenótipo de macrófagos humanos.** 2016. 94 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A maioria das células tumorais apresenta metabolismo alterado com grande consumo de glicose e elevada secreção de lactato. Esse metabólito acumula-se no microambiente tumoral e possui importante papel na modulação do infiltrado inflamatório, estando associado a um pior prognóstico quando presente em elevadas concentrações. O microambiente tumoral é composto por um conjunto de diferentes células e fatores, sendo os macrófagos uma das principais células associadas à manutenção e progressão tumoral. Em câncer do colo uterino, os macrófagos apresentam papel supressor da resposta imune e estão associados com a progressão da doença. O lactato está associado a indução de fenótipo supressor em diferentes células do sistema imune, dentre estas os macrófagos. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do lactato no fenótipo de monócitos diferenciados em macrófagos na presença de células tumorais derivadas de câncer do colo uterino. Linhagens celulares positivas para HPV16 (SiHa e CasKi), positivas para HPV18 (HeLa e SW756) e negativa para HPV (C33) foram utilizadas para formação de esferoides tumorais. Monócitos isolados de doadores saudáveis foram adicionados aos esferoides tumorais para diferenciação em macrófagos. Macrófagos cultivados com linhagens tumorais positivas para HPV apresentaram um fenótipo misto e pró-tumoral, enquanto os cultivados com a linhagem negativa, um fenótipo mais pró-inflamatório. A inibição da enzima lactato desidrogenase, nas células tumorais, alterou o fenótipo desses macrófagos. A expressão de HLA-DR, CD206, CD86 e CD64 foi reduzida nos macrófagos cultivados com as linhagens tumorais positivas para HPV, enquanto a expressão de HLA-DR e de CD206 foi aumentada nos cultivados com a linhagem negativa. A secreção das citocinas IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-10 também foi diminuída nos macrófagos dos esferoides das linhagens HPV positivas e se manteve inalterada ou aumentou nos esferoides da linhagem negativa. O bloqueio da enzima ainda induziu maior proliferação linfocitária induzida pelos macrófagos isolados de co-culturas com a linhagem celular positiva para HPV. O lactato tem papel na modulação de diferentes aspectos relacionados aos macrófagos tumorais e age diferentemente nos macrófagos associados as linhagens HPV positivas e negativa.

Palavras-chave: Câncer cervical. Papilomavírus humano. Macrófagos. Imunomodulação. Lactato.

ABSTRACT

STONE, S. C. **The role of HPV-associated tumor metabolism on human macrophage phenotype**. 2016. 94 p. Ph. D. thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Most tumor cells possess an altered metabolism with high glucose consumption and lactate secretion. Lactate accumulates in tumor microenvironment and has an important role in the modulation of tumor infiltrating cells. Its elevated concentration is correlated with a worse prognosis in cancer patients. The tumor microenvironment is composed by a group of different cells and factors. Macrophages are one of the most frequent cells in tumor microenvironment, being associated with tumor maintenance and progression. In cervical cancer, macrophages suppress the anti-tumor immune response and are associated with tumor progression. Lactate is linked with the induction of a suppressor phenotype of several immune cells, among those, the macrophages. The aim of this work was to evaluate the effect of lactate secreted by cervical cancer cells lines on the phenotype of monocyte-derived macrophages. Cervical cancer cell lines (HPV 16 positive: SiHa and CasKi, HPV 18 positive: HeLa e SW756 and HPV negative: C33) were used to create tumor spheroids. Monocytes isolated from healthy donors were added to tumor spheroids and incubated for six days, for macrophage differentiation. HPV associated tumor macrophages displayed a mixed phenotype associated with a pro-tumor effect, while HPV negative tumor macrophages displayed a M1-like phenotype. When the lactate dehydrogenase enzyme in tumor cells was blocked, several aspects of tumor associated macrophages were affected. The expression of surface markers HLA-DR, CD206, CD64 and CD86 were downregulated in HPV positive tumor associated macrophages while the expression of CD206 and HLA-DR were upregulated in the HPV negative tumor associated macrophages. The secretion of IL-6, IL-10, IL-1 β and TNF- α were downregulated in HPV positive tumor associated macrophages, and were unaltered or upregulated in the HPV negative one. The enzyme blockage also induced a higher T cell proliferation by macrophages isolated from a HPV positive cell line. Lactate modulates several aspects on tumor associated macrophages and acts differently on macrophages associated with HPV positive and negative cells lines.

Keywords: Cervical cancer. Human Papilomavirus. Macrophage. Immunomodulation. Lactate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo energético de células com alta taxa de proliferação.	26
Figura 2 – Curva de dose de oxamato em esferoides de linhagens celulares de câncer do colo uterino.	35
Figura 3 – Ensaio dose-resposta de CHC sobre a viabilidade de linhagens celulares derivadas de câncer cervical.....	35
Figura 4 - Esquema de tratamento de esferoides tumorais com inibidores de metabolismo. .	36
Figura 5 – Esferoides de linhagens celulares de câncer do colo uterino.	40
Figura 6 – Esferoides de linhagens celulares de câncer do colo uterino após a adição de monócitos humanos.	41
Figura 7 – Estratégia de análise da população de macrófagos presente nos esferoides tumorais.	42
Figura 8 – Infiltrado inflamatório em esferoides de linhagens celulares de câncer do colo uterino.	44
Figura 9 – Gráficos representativos da expressão de marcadores de superfície em macrófagos associados a esferoides de linhagens tumorais de câncer cervical	46
Figura 10 - Infiltrado inflamatório em esferoides da linhagem celular C33 com diferentes quantidades de células.....	47
Figura 11 – Citocinas secretadas por macrófagos cultivados em esferoides tumorais de linhagens celulares de câncer do colo uterino	48
Figura 12 – Viabilidade celular dos esferoides tumorais de linhagens celulares de câncer do colo uterino.	49
Figura 13 – Proliferação celular nos esferoides das linhagens celulares C33 e SW756.	50
Figura 14 – Concentração de lactato no sobrenadante de esferoides de linhagens celulares de câncer do colo uterino.	51
Figura 15 – Efeito do inibidor oxamato na produção de lactato e no consumo de glicose em esferoides de linhagens celulares de câncer do colo uterino.	52
Figura 16 – Correlação entre o consumo de glicose e a produção de lactato em esferoides de linhagens celulares de câncer do colo uterino.	53
Figura 17 – Bloqueio da via glicolítica em esferoides de linhagens celulares de câncer do colo uterino.	54
Figura 18 – Infiltrado inflamatório em esferoides de linhagens celulares de câncer do colo uterino tratados com inibidor de lactato desidrogenase.	55
Figura 19 - Intensidade de fluorescência mediana (MFI) de cada molécula do infiltrado inflamatório	57
Figura 20 – Número celular dos esferoides tumorais de linhagens celulares de câncer do colo uterino tratados com oxamato.	58
Figura 21 – Número celular dos esferoides tumorais de linhagens celulares de câncer do colo uterino tratados com oxamato.	60
Figura 22 – Vias de sinalização em esferoides de linhagens celulares de câncer do colo uterino tratados com oxamato.	62

Figura 23 – Efeito de macrófagos isolados de esferoides de linhagens celulares de câncer cervical na proliferação de linfócitos T.....	65
Figura 24 - Efeito de macrófagos isolados de esferoides de linhagens celulares de câncer cervical na expressão de citocinas por linfócitos T.	66
Figura 25 – Infiltrado inflamatório em esferoides de linhagens celulares derivadas de câncer do colo uterino tratados com inibidor de MCT-1.....	68
Figura 26 – Expressão de marcadores de superfície em macrófagos-derivados de monócitos tratados com lactato.	71
Figura 27 - Expressão de citocinas por macrófagos-derivados de monócitos tratados com lactato.	72
Figura 28 – Morte celular em macrófagos-derivados de monócitos tratados com lactato.	73
Figura 29 - Possíveis vias reguladas por lactato em macrófagos.	80
Figura 30 - Efeitos na modulação do fenótipo de macrófagos pelo lactato secretado por linhagens tumorais derivadas de câncer cervical.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos utilizados para a análise de moléculas de superfície de macrófagos....33

Tabela 2 – Número de células em esferoides tumorais de quatro dias. 41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	proteína quinase B
ATP	adenosina trifosfato
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
E	<i>Early</i>
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGF-R	Receptor do fator de crescimento epidérmico
HIF	Hypoxia-inducible factor
HPV	Papilomavírus Humano
hTERT	<i>human Telomerase Reverse Transcriptase</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
L	<i>Late</i>
LCR	<i>Long Control Region</i>
LDH	Lactato desidrogenase
MCT	Canais transportadores de monocarboxilato
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MMP	Metaloproteinase da Matriz
mTORC1	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	<i>Natural Killer</i>
PDH	Piruvato desidrogenase
PGC-1β	PPARγ-coativador-1 β
PK-M2	Piruvato quinase
PPARγ	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
pRB	Proteína do Retinoblastoma
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
SOCS	Supressor de sinalização de citocina

STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição
TAM	Macrófago associado ao tumor
TAP	Transportador associado com o processamento antigênico
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
Th	Linfócito T “helper”
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado a TNF
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Câncer cervical.....	15
1.2	Papilomavírus Humano	15
1.3	Papilomavírus humano e o sistema imunológico.....	18
1.4	Macrófagos associados ao tumor	20
1.5	Metabolismo tumoral	23
2	OBJETIVO	30
2.1	Objetivo geral.....	30
2.2	Objetivos específicos.....	30
3	METODOLOGIA.....	31
3.1	Cultura de esferoides tumorais.....	31
3.2	Isolamento de monócitos humanos	31
3.3	Cultura de macrófagos derivados de monócitos	32
3.4	Avaliação da expressão de moléculas de superfície nos macrófagos	33
3.5	Avaliação das citocinas produzidas pelos macrófagos	34
3.6	Curva de dose de inibidores metabólicos.....	34
3.7	Tratamento com inibidores.....	36
3.8	Quantificação de lactato e de glicose	36
3.9	Ensaio de proliferação de linfócitos T	37
3.10	Avaliação das citocinas produzidas por linfócitos.....	37
3.11	Avaliação de vias de sinalização nos macrófagos	38
3.12	Análise Estatística	38
4	RESULTADOS	39
4.1	Padronização dos esferoides tumorais.....	39

4.2	Infiltrado de macrófagos em esferoides tumorais de câncer do colo uterino.....	41
4.2.1	Produção de citocinas pelos macrófagos tumorais.....	47
4.2.2	Viabilidade celular das células tumorais nos esferoides	49
4.3	Efeito do metabolismo tumoral.....	50
4.3.1	Efeito da inibição de LDH no metabolismo das células tumorais	51
4.3.2	Efeito da inibição da enzima LDH no fenótipo de macrófagos presentes nos esferoides tumorais.....	54
4.3.3	Efeito do tratamento com oxamato no número de células nos esferoides.....	58
4.3.4	Produção de citocinas nos esferoides tratados com oxamato	59
4.3.5	Ativação de vias de sinalização nos esferoides tumorais	61
4.3.6	Efeito de macrófagos associados aos esferoides na proliferação de linfócitos.....	63
4.3.7	Efeito do bloqueio do canal transportador de monocarboxilato no fenótipo de macrófagos	67
4.4	Efeito do lactato em macrófagos-derivados de monócitos	69
5	DISCUSSÃO	74
6	CONCLUSÕES.....	82
	REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer cervical

Mundialmente o câncer cervical, ou câncer do colo uterino, é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres. Com uma estimativa de mais de meio milhão de pessoas acometidas somente no ano de 2012, a grande maioria dos casos ocorre em mulheres de países em desenvolvimento (GLOBOCAN, 2012). No Brasil, ocupa o terceiro lugar entre os tipos de câncer mais frequentes em mulheres, com um risco estimado em 15,33 casos a cada 100 mil mulheres, sendo o tipo mais frequente em mulheres na região norte do país (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER - INCA, 2014).

O principal fator etiológico envolvido no câncer cervical é a infecção persistente por Papilomavírus Humano (HPV). O vírus está associado a virtualmente todos os casos de câncer cervical, sendo detectado em 99,7% dos casos (WALBOOMERS et al., 1999). Apesar da forte associação entre o HPV e o câncer cervical, apenas uma pequena parcela das mulheres infectadas desenvolve câncer. Além da infecção persistente pelo vírus, outros co-fatores são necessários para o desenvolvimento da doença, tais como, estilo de vida, imunossupressão e co-infecção com outros agentes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

1.2 Papilomavírus Humano

Os Papilomavírus possuem material genético constituído por DNA circular dupla-fita com aproximadamente 8.000 pares de base, envolvido em um capsídeo protéico icosaédrico. Seu genoma codifica seis proteínas precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7. E: *early*/precoce) e duas proteínas tardias (L1 e L2. L: *late*/tardio), conforme sua expressão durante o ciclo viral. O vírus tem tropismo pelo tecido epitelial, infectando a pele ou a mucosa de diferentes vertebrados. A infecção por Papilomavírus pode causar lesões benignas (verrugas e papilomas) ou malignas (câncer) dependendo do tipo viral (DE VILLIERS et al., 2004).

A determinação do tipo viral é baseada na variabilidade do gene viral L1, que codifica para a proteína L1, a qual juntamente com a proteína L2 forma a estrutura do

capsídeo viral. Um tipo é definido quando a sequência gênica de L1 difere pelo menos 10% de outro tipo de Papilomavírus já estabelecido (BERNARD et al., 2010).

Em humanos, há mais de 200 tipos de Papilomavírus os quais são classificados em cinco gêneros: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gamma papillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus* (BERNARD et al., 2010; EGAWA et al., 2015). Os cerca de 40 tipos de HPV pertencentes ao gênero *Alphapapillomavirus* podem ser divididos em tipos de baixo e de alto risco oncogênico.

Os principais tipos de HPV considerados de baixo risco oncogênico são HPV-6 e 11. Quando infectam o tecido epitelial podem causar lesões benignas em mucosas anogenitais e orofaríngeas. Diferentemente, os tipos de HPV considerados de alto risco oncogênico são associados a lesões neoplásicas e câncer. Os tipos mais comuns de HPV de alto risco são HPV 16, 18, 33 e 34, sendo que os HPV-16 e 18 são responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer cervical. Estes também podem causar tumores em outros sítios anatômicos como cabeça e pescoço, vulva, anus e pênis (DE VILLIERS et al., 2004; DOORBAR, 2005).

Para que a infecção pelo HPV ocorra, o vírus deve ter acesso aos queratinócitos da camada basal do tecido epitelial. Essas células estão presentes entre as junções do tecido epitelial estratificado e glandular, ou são expostas quando o tecido apresenta lesões (WHITESIDE; SIEGEL; UNGER, 2008). Após a infecção do queratinócito basal, ocorre uma fase de expansão do genoma viral seguida da manutenção do genoma episomal em baixo número de cópia (STANLEY, 2012). Nessa fase, a expressão das duas proteínas precoces do HPV, E1 e E2 são necessárias para manutenção do genoma episomal (WILSON et al., 2002).

Queratinócitos basais não infectados cessam a proliferação ao atingirem as camadas suprabasais, entrando em fase de diferenciação terminal. No entanto, a infecção por HPV atrasa a diferenciação terminal mantendo o ciclo celular ativo. Para isto, é necessária a expressão das proteínas precoces do vírus, E4, E5, E6 e E7. Quando os queratinócitos infectados atingem as camadas suprabasais, a expressão dessas proteínas é aumentada e ocorre uma fase de proliferação celular e amplificação do DNA viral. Finalizada esta etapa, os queratinócitos infectados progridem na diferenciação epitelial e atingem as camadas externas, onde as proteínas de fase tardia, L1 e L2, são expressas para a formação do capsídeo viral e consequente liberação da partícula viral (DOORBAR, 2005; OZBUN; MEYERS, 1998).

As proteínas E6 e E7 são consideradas as oncoproteínas do HPV por possuírem capacidade de imortalização das células infectadas, sendo que a expressão de ambas é necessária neste processo (MÜNGER et al., 1989). A proteína E6, através da interação com E6AP, subunidade E3 do sistema proteassoma, recruta a proteína reguladora do ciclo celular, p53, ocasionando sua degradação (SCHEFFNER et al., 1990). E6 também está envolvida na indução da atividade da subunidade catalítica da enzima telomerase, hTERT, contribuindo para a manutenção dos telômeros durante a replicação do genoma celular (KIYONO et al., 1998). A proteína E7 está envolvida na inativação da proteína do retinoblastoma (pRB) via proteassoma, o que resulta na perda do controle da transição G1/S do ciclo celular (DYSON et al., 1989). Além da inibição de reguladores do ciclo celular, as proteínas E6 e E7 também contribuem para a desregulação da divisão celular e instabilidade genômica por promoverem anomalias nos centrôssomos (DUENSING et al., 2000).

A proteína E5 auxilia na eficiência de imortalização celular por E6 e E7 por retardar a degradação e internalização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF-R), além de aumentar a atividade de EGF (STÖPPLER et al., 1996; STRAIGHT et al., 1993). A proteína também confere proteção contra a apoptose via FasL e TRAIL (KABSCH et al., 2004). A proteína E4 contribui para a amplificação do genoma viral, também sendo muito expressa nas camadas mais externas do epitélio onde auxilia na montagem e liberação das novas partículas virais (DOORBAR, 2013).

As proteínas E1 e E2 controlam a replicação viral e regulam a transcrição gênica através da região promotora viral (LCR: *Long Control Region*). Quando o genoma viral permanece episssomal, como ocorre em células infectadas por HPV de baixo risco oncogênico e nas lesões precursoras de baixo grau, a expressão de E6 e E7 é fortemente controlada pela ação de E2 na LCR. A infecção persistente por HPV de alto risco oncogênico pode ocasionar a integração do genoma viral na célula infectada. A ruptura do genoma viral circular para a integração ao genoma da célula infectada ocorre ao acaso. No entanto, quando ocorre uma fragmentação na região de E2, a LCR não sofre mais influência desse controle e a expressão de E6 e E7 aumenta. A integração viral também é acompanhada pela perda dos genes adjacentes a E2: E4, E5 e parte de L2 (ZUR HAUSEN, 2002). Com a expressão desenfreada dessas oncoproteínas, a célula infectada apresenta proliferação descontrolada e maior eficácia de imortalização (JEON; ALLEN-HOFFMANN; LAMBERT, 1995; ROMANCZUK; HOWLEY, 1992). O HPV não transforma as células infectadas, no entanto, células imortalizadas com proliferação

descontrolada estão mais propensas a acúmulos de erros e mutações no genoma e consequente transformação (FEHRMANN; LAIMINS, 2003). Apesar do HPV não transformar células infectadas, a manutenção de seu genoma é necessária para a permanência do fenótipo transformado (GOODWIN; DIMAIO, 2000).

1.3 Papilomavírus humano e o sistema imunológico

Estima-se que apenas 10% das pessoas infectadas por HPV não são capazes de eliminar naturalmente o vírus, desencadeando uma infecção persistente (MOSCICKI et al., 2006). Por outro lado, pessoas imunossuprimidas, com redução de linfócitos T CD4, exibem um maior risco para a infecção persistente e agravamento das lesões do colo uterino (PALEFSKY et al., 1999). Esses dados indicam que o sistema imunológico consegue reconhecer e combater o vírus, e que essa resposta parece mais dependente da resposta celular. De fato, diversos estudos apontam que a resolução da infecção estaria associada a uma resposta celular. A regressão espontânea de verrugas genitais é acompanhada por um aumento de infiltrado de macrófagos, células NK e linfócitos T CD8 (COLEMAN et al., 1994). A progressão ao câncer cervical está relacionada a uma resposta imune ineficiente contra as proteínas virais E2, E6 e E7. Contrário ao observado na regressão da doença pela resposta proliferativa de linfócitos T CD4, onde a exposição ao antígeno leva à secreção de IL-2, IFN γ , TNF α , IL-5 e IL-10, em pacientes com câncer, estímulo com antígenos virais resulta apenas em secreção de IL-10 (DE JONG et al., 2004; WELTERS et al., 2006). A ineficiência da resposta imune pode ser relacionada ao ambiente supressor desencadeado por linfócitos T supressores (VAN DER BURG et al., 2007; VISSER et al., 2007). De fato uma maior razão de linfócitos T CD8 para linfócitos T reguladores é sinal de bom prognóstico, associada ao risco de metástase linfonodal em pacientes com câncer cervical avançado (PIERSMA et al., 2007).

O ambiente supressor também pode ser favorecido pelas células da imunidade inata. Células dendríticas presentes nas lesões associadas ao HPV, são pouco eficientes na apresentação antigênica e favorecem, através da expressão da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), o fenótipo regulador em linfócitos T presentes nas lesões (KOBAYASHI et al., 2008). Os macrófagos presentes nas lesões precursoras e no

câncer também auxiliam e promovem um ambiente supressor, conforme será descrito adiante.

A resposta humoral geralmente é responsável pela neutralização das partículas virais pelo reconhecimento da proteína do capsídeo L1. Nem todas as mulheres infectadas fazem a soroconversão, etapa que leva em torno de 12 meses e que produz baixos títulos de anticorpos (CARTER et al., 2000). No entanto, estes são neutralizantes, capazes de conferir proteção contra a reinfecção durante anos (GEIJERSSTAM et al., 1998). O desenvolvimento de partículas virais em laboratório (VLP- *virus-like particles*) contendo a proteína L1 possibilitou o desenvolvimento de vacinas profiláticas com alta taxa de soroconversão com produção de anticorpos IgGs neutralizantes (EINSTEIN et al., 2009). Atualmente estão disponíveis no mercado duas vacinas profiláticas. A vacina bivalente que confere proteção contra HPV 16 e 18, e a vacina tetravalente, que além de conferir proteção contra HPV 16 e 18 também age contra os dois tipos mais envolvidos em verrugas, HPV 6 e 11 (STANLEY, 2008). Apesar da disponibilidade de vacinas contra o HPV, o câncer cervical ainda é um importante problema de saúde pública, devido à baixa adesão da população à vacinação, à não proteção de mulheres já infectadas (por se tratar de uma vacina profilática) e ainda à não cobertura à todos os tipos de HPV oncogênicos (LEPIQUE; RABACHINI; VILLA, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

A maior parte das pessoas infectadas elimina o vírus e as lesões precursoras espontaneamente. Porém, assim como os hospedeiros desenvolveram respostas imunes contra o vírus, os vírus desenvolveram alguns mecanismos de evasão da resposta imune, dificultando sua eliminação em parte das pessoas infectadas. A infecção pelo vírus HPV é silenciosa, ou seja, o vírus não apresenta ciclo lítico e a expressão das proteínas virais ocorre conforme a diferenciação dos queratinócitos, de forma que as proteínas do capsídeo, que são as mais imunogênicas, são somente expressas quando o vírus atinge as camadas mais externas, local de menor concentração de células apresentadoras de antígeno (TINDLE, 2002). Quando uma célula é infectada por vírus, esta passa a produzir IFN do tipo 1 como mecanismo de proteção. No entanto, as proteínas virais E6 e E7 regulam essa expressão pela interação com IRFs (*Interferon Regulatory Factor*) (ANTONSSON et al., 2006; RONCO et al., 1998; UM et al., 2002). As proteínas virais também podem alterar a maquinaria de apresentação antigênica, pela diminuição da expressão de MHC de classe I pela ação da proteína E5 e pela inibição da expressão de TAP-1 pela proteína E7 (ASHRAFI et al., 2005; W. et al., 2010; ZHANG et al., 2003).

As proteínas E6 e E7 também são responsáveis pela diminuição da transcrição de TLR9 em queratinócitos infectados (HASAN et al., 2007).

1.4 Macrófagos associados ao tumor

Os tumores além de compostos por células tumorais possuem um infiltrado inflamatório de diferentes células da imunidade inata e adaptativa, além de matriz extracelular, fibroblastos, vasos e pericitos, constituindo o microambiente tumoral. Uma das principais células encontradas nesse microambiente são os macrófagos, sendo denominados, macrófagos associados a tumores (TAM) (LORUSSO; RÜEGG, 2008).

Macrófagos são células de origem hematopoiética considerados fagócitos profissionais, pelo seu papel na fagocitose de partículas exógenas ou endógenas. Presentes em diferentes tecidos, macrófagos contribuem para a homeostase tecidual, apresentando funções tecido-específica. A maioria dos macrófagos teciduais é originária de precursores embrionários que se auto-renovam durante a vida adulta (GOMEZ PERDIGUERO et al., 2014; HASHIMOTO et al., 2013). Por outro lado, os macrófagos presentes em locais de inflamação, são, na maioria, originários de monócitos. Estas células estão presentes na corrente sanguínea e são rapidamente recrutadas para os sítios de inflamação, onde se diferenciam em células dendríticas ou macrófagos (GINHOUX; JUNG, 2014).

Nos locais de inflamação, os monócitos se diferenciam em diferentes fenótipos de macrófagos, de acordo com o microambiente local (STOUT et al., 2005). Tradicionalmente, os macrófagos são subdivididos em dois fenótipos fazendo alusão aos fenótipos Th1 e Th2 de linfócitos T: o fenótipo clássico, ou M1 e o fenótipo alternativo, ou M2.

Os macrófagos do tipo M1 são polarizados principalmente pelo estímulo de IFN- γ , LPS e TNF- α e estão envolvidos em respostas inflamatórias, eliminação de patógenos intracelulares e resposta anti-tumoral. Este fenótipo é caracterizado pela expressão de citocinas pró-inflamatórias (como IL-1 β e TNF- α), produção de espécies reativas de oxigênio e atividade da enzima iNOS (MUNDER, EICHMANN, 1998; NATHAN; DING, 2010). Já os macrófagos alternativamente ativados, ou M2, são desenvolvidos em resposta a IL-4 e IL-13, e atuam no reparo tecidual, eliminação de parasitas e resposta pró-tumoral (STEIN et al., 1992). Caracterizam-se, pela expressão de citocinas

anti-inflamatórias, atividade da enzima arginase e alta expressão de receptores tipo *scavenger* (GORDON; MARTINEZ, 2010; MUNDER; EICHMANN, 1998).

Fatores moleculares são necessários para a polarização dos macrófagos. Em macrófagos M1, STAT1 regula a expressão da maioria dos genes associados a este fenótipo. Enquanto nos macrófagos M2, as principais vias de sinalização ativadas são STAT6 e STAT3. A atividade dos STAT pode ser regulada por membros da família de proteínas SOCS (STARR et al., 1997). SOCS-3 atua inibindo as vias de STAT3 e PI3K, enquanto SOCS-1 está envolvida na inibição das vias de NF-kB e STAT1 (WILSON, 2014).

A classificação entre os dois fenótipos de macrófagos, M1 e M2, é considerada restritiva, uma vez que macrófagos podem apresentar diferentes estágios entre estes fenótipos (HEUSINKVELD; VAN DER BURG, 2011; POLLARD, 2009). De fato, em algumas enfermidades, como o câncer, os macrófagos podem apresentar estágios de ativação mistos, caracterizados pela expressão de fatores associados a ambos fenótipos M1 e M2 (PETTERSEN et al., 2011; VOGEL et al., 2013). Alternativamente, uma terceira classificação foi sugerida, onde os macrófagos são agrupados em macrófagos clássicos, macrófagos reparadores, envolvidos na manutenção da homeostase tecidual, e macrófagos reguladores (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Na maioria dos tipos de câncer, a maior densidade de macrófagos está associada ao pior prognóstico, isto deve-se as características pró-tumorais apresentadas por esses macrófagos (MURDOCH et al., 2008). No entanto, em alguns casos, os TAM podem apresentar respostas anti-tumorais. Essa resposta pode ser efetuada tanto por mecanismos diretos de citotoxicidade, como pela produção de TNF- α e intermediários reativos de oxigênio, como indiretos, pelo recrutamento e ativação de outras células com resposta anti-tumoral (BINGLE; BROWN; LEWIS, 2002).

Na maioria dos tumores, os TAM estão associados ao crescimento e progressão tumoral (POLLARD, 2004). Esses, secretam citocinas anti-inflamatórias, principalmente IL-10, para o estabelecimento de um ambiente supressor, a fim de evitar respostas anti-tumorais, e ainda recrutam células T reguladoras para ampliar a supressão (CURIEL et al., 2004; SICA et al., 2000). Os TAM também são considerados fundamentais para a angiogênese e metástase tumoral, mecanismo mediado pela expressão de MMP9 (Metaloproteinase da Matriz-9) e VEGF (GIRAUDO; INOUE; HANAHAN, 2004). Através da secreção de fatores de crescimento, como TGF- β e

ligantes de EGF-R, podem promover a proliferação de células tumorais (POLLARD, 2004).

O aumento do número de macrófagos infiltrantes é proporcional ao grau das lesões cervicais após infecção por HPV (HAMMES et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2000). Nosso laboratório demonstrou, em modelo animal de tumor associado ao HPV16, que a principal população de células do infiltrado tumoral é a de macrófagos supressores. Estes promovem o crescimento tumoral e inibem a resposta de células T antitumorais, favorecendo a expansão de células T reguladoras (LEPIQUE et al., 2009). O mecanismo pelo qual estes macrófagos exercem estas atividades está associado à produção de IL-10 (BOLPETTI et al., 2010). Em macrófagos humanos tratados com meio condicionado por linhagens celulares derivadas de câncer cervical, a modulação para o fenótipo M2 parece dependente de IL-6 e prostaglandina E2 (HEUSINKVELD et al., 2011). Além disso, dados do nosso laboratório indicam que há aumento significativo da frequência de macrófagos M2 em biopsias de câncer invasivo do colo uterino, em comparação com biopsias de lesões precursoras. Bem como uma correlação inversa entre a frequência de macrófagos M2 e de linfócitos CD4 e CD8 (ALVAREZ, manuscrito em preparação).

No ambiente tumoral, a hipóxia está diretamente relacionada a frequência de TAM, que é mais elevada em tumores com altos níveis de hipóxia (MURDOCH et al., 2008). Esta promove mudanças no fenótipo dos macrófagos, tornando-os imunossupressores e pró-tumorais, devido a maior expressão de fatores de crescimento, metaloproteinasas, VEGF e IL-8 (BURKE et al., 2003). Assim como as células tumorais, nos macrófagos, um dos mediadores dos efeitos da hipóxia são os fatores de transcrição HIF-1 ou HIF-2, que induzem a expressão de genes reguladores ou da própria via glicolítica, promovendo a glicólise aeróbica nos macrófagos (LEWIS; MURDOCH, 2005).

O metabolismo energético apresenta diferenças entre os fenótipos de macrófagos: macrófagos M1 realizam glicólise enquanto macrófagos M2, oxidação fosforilativa e metabolização de ácidos graxos. A inibição da via glicolítica em macrófagos M1 favorece o fenótipo M2, enquanto a inibição do metabolismo oxidativo induz o fenótipo M1 (GALVÁN-PEÑA; O'NEILL, 2014). A ativação de macrófagos murinos por LPS induz o fenótipo M1, promovendo a glicólise aeróbica via estabilização de HIF-1 α (TANNAHILL et al., 2013), mecanismo mediado pelo acúmulo do intermediário do ciclo de Krebs, succinato, e pela elevada expressão da enzima PK-M2, ambos induzidos por LPS (PALSSON-MCDERMOTT et al., 2015; TANNAHILL

et al., 2013). Macrófagos M1 também apresentam o ciclo de Krebs interrompido nas etapas seguidas à geração dos intermediários citrato e succinato ocasionando um acúmulo destes, bem como de malato. Contrariamente, macrófagos M2 não possuem interrupções no ciclo de Krebs, que funciona plenamente (JHA et al., 2015). Um dos principais mediadores da oxidação fosforilativa e metabolismo de ácidos graxos em macrófagos M2 é a via de STAT6. Contrariamente aos macrófagos tratados com IFN- γ e LPS, que apresentam aumento na expressão de genes associados a inflamação, além de HIF-1 α ; a sinalização por IL-4 promove um aumento nos genes relacionados a captação, transporte e oxidação de ácidos graxos. Essa citocina ativa a via de STAT6, envolvida na ativação de PGC-1 β , que em contrapartida promove a amplificação do sinal de STAT6, sendo ambos os fatores necessários para o fenótipo energético dos macrófagos M2 (VATS et al., 2006). Além do coativador beta do PPAR γ (PGC-1 β), o próprio PPAR γ ativado pela citocina IL-4 induz o fenótipo M2, aumentando a expressão de diversos genes relacionados ao metabolismo de ácidos graxos (ODEGAARD et al., 2007). A citocina IL-4 também induz a ativação da via Akt/mTORC1, responsável pela indução de alguns genes associados ao fenótipo M2 (COVARRUBIAS et al., 2016).

Os fatores de transcrição HIF-1 e HIF-2 podem apresentar efeitos independentes ou contrários nos macrófagos. HIF-2 é altamente expresso em macrófagos associados a tumores de diferentes tipos de câncer, ao contrário de HIF-1 (TALKS et al., 2000). De fato, HIF-2 é necessário para a migração de TAM para o tumor e adicional progressão tumoral (IMTIYAZ et al., 2010). No entanto, outros estudos sugerem que o fenótipo M2 em TAMs é dependente de HIF-1 α , mediado tanto pela atividade do oncogene c-Myc quanto por lactato (COLEGIO et al., 2014; PELLO et al., 2012).

1.5 Metabolismo tumoral

Em 2011, Hanahan e Weinberg publicaram uma nova versão da sua famosa revisão “Hallmarks of cancer”, incluindo quatro novos aspectos da biologia tumoral, incluindo a reprogramação do metabolismo energético nas células tumorais (Figura 1) (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Diferentemente das células normais que, em condição de suprimento normal de oxigênio, oxidam a glicose via ciclo de Krebs, para produção de energia, as células tumorais utilizam preferencialmente a via glicolítica para o processamento final da glicose (DeBERARDINIS et al., 2008). Portanto,

independentemente da presença de oxigênio, a célula tumoral geralmente opta pela via glicolítica; processo denominado glicólise aeróbica, descrito por Otto Warburg e assim também denominado “efeito Warburg” (WARBURG, 1956).

Apesar da utilização da glicose pela via glicolítica ser um processo de baixa eficiência energética quando comparado a oxidação fosforilativa (produção de 2 ATPs contra 36 ATPs pela via fosforilativa por molécula de glicose), estima-se que a célula tumoral produza cerca de 10% mais ATP do que uma célula normal em um mesmo período (KOPPENOL; BOUNDS; DANG, 2011; WARBURG, 1956). A célula tumoral possui uma elevada captação de glicose e sua utilização pela via glicolítica é um processo mais rápido do que a oxidação completa de uma molécula de glicose nas células normais (KOPPENOL; BOUNDS; DANG, 2011). A maior captação de glicose também fornece mais carbonos para a síntese de biomoléculas, fundamentais para a produção de novas células. Uma célula em proliferação necessita tanto de energia como de biomoléculas, portanto não seria eficaz a utilização de toda glicose captada para geração de ATP, sendo necessário o desvio de algumas moléculas para síntese de precursores moleculares como acetil-CoA, intermediários glicolíticos e ribose (FERON, 2009).

Quando uma molécula de glicose é captada pela célula via seu receptor GLUT-1, é imediatamente fosforilada, originando a glicose-6-fosfato. Esta pode seguir na via glicolítica ou ser desviada para a via das pentoses fosfatos (PPP), via responsável pela geração de ribose-5 fosfato e de NADPH, que contribui para a síntese de ácidos carboxílicos, além de conferir proteção contra ROS (espécies reativas de oxigênio). Devido ao metabolismo alterado das células tumorais, há uma maior produção de espécies reativas (ROS), comparado às células normais (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011). Essas espécies reativas podem tanto promover o aumento de mutações no DNA celular quanto em elevadas concentrações, como apresentar atividade citotóxica (ISHIKAWA et al., 2008; TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009). Para contornar a citotoxicidade, as células tumorais necessitam de uma elevada produção de NADPH que irá atuar como agente redutor na eliminação de ROS (NATHAN; DING, 2010).

A glicose-6-fosfato que segue na via glicolítica será convertida em duas moléculas de piruvato que possuem dois destinos: continuar na via glicolítica sendo convertida pela enzima lactato desidrogenase A (LDH-A) ao produto final, lactato, ou entrar no ciclo de Krebs, pela ação da enzima piruvato desidrogenase (PDH). Em

células proliferativas a atividade da enzima LDH-A é mais elevada que a da enzima PDH, constituindo um método mais rápido de evitar o acúmulo de piruvato intracelular (CURI; NEWSHOLME; NEWSHOLME, 1988). De fato, quando a enzima LDH-A é bloqueada em células tumorais, ocorre um estímulo à via da fosforilação oxidativa a fim de consumir o piruvato. Essas células tumorais ainda apresentam uma menor taxa proliferativa em hipóxia e menor capacidade de tumorigênese (FANTIN; ST-PIERRE; LEDER, 2006). A enzima glicolítica piruvato quinase (PK), responsável pela conversão de enol-piruvato para piruvato, também é alterada nas células tumorais. Essa enzima possui duas isoformas, sendo que as células tumorais expressam exclusivamente a isoforma embrionária, M2. Desta forma, PK-M2 é necessária para a manutenção do efeito Warburg, uma vez que a substituição pela isoforma M1 diminui a produção de lactato e aumenta o consumo de oxigênio (CHRISTOFK et al., 2008).

Apesar do desvio do processamento de glicose para a via glicolítica, a via de oxidação fosforilativa ainda é ativa nas células tumorais, que possuem mitocôndrias funcionais. Contrário às células normais (com baixa taxa proliferativa), onde o ciclo de Krebs é principalmente utilizado para obtenção de ATP, nas células tumorais este ciclo é utilizado para a produção de intermediários para a síntese de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (DeBERARDINIS et al., 2008).

Aliado ao aumento do consumo de glicose, as células tumorais são também mais ávidas pelo consumo de glutamina. A glutamina metabolizada pode dar origem ao intermediário do ciclo de Krebs, α -cetoglutarato que é convertido a citrato, estando envolvido na síntese de novo de lipídios. Neste processo também ocorre elevada produção de NADPH que irá atuar na eliminação de ROS (DeBERARDINIS et al., 2007).

Figura 1 - Metabolismo energético de células com alta taxa de proliferação.

Ilustração das principais vias energéticas das células tumorais: glicólise, via das pentoses-fosfato, glutaminólise e ciclo de Krebs (ou ciclo do ácido cítrico – TCA). Retirado de: Vermeersch KA, Styczynski MP. Applications of metabolomics in cancer research. J Carcinog 2013;12:19.

A maior eficiência de glicólise apresentada pelas células tumorais é associada a diversos fatores, como atividade de oncogenes, hipóxia e atividade de proteína quinase B (Akt) (GOTTFRIED; KREUTZ; MACKENSEN, 2012). A hipóxia, redução da pressão parcial de oxigênio nos tecidos, é responsável pela indução de vários genes associados não somente a via glicolítica, mas também à proliferação celular e angiogênese. Deste modo, a hipóxia está associada à agressividade e a progressão tumoral (ZHONG et al., 2000). O principal mediador dos efeitos desencadeados pela hipóxia é o fator de transcrição HIF-1 α . Este fator faz parte do complexo HIF-1, e em condições de normóxia, é associado a PHD (*prolyl hydroxylase domain enzyme*) que promove sua degradação via proteassomo (BERRA et al., 2003). Durante a hipóxia, PHD é inibido por um processo dependente da ação de ROS mitocondrial, ocasionando

a estabilização de HIF-1 α (GUZY et al., 2005). Além da hipóxia, em células tumorais outros fatores estão envolvidos no aumento da expressão de HIF-1 α , tais como oncogenes e fatores de crescimento (ZHONG et al., 2000). Além da ativação de diversas proteínas e enzimas glicolíticas, destaca-se que HIF-1 α aumenta a expressão de LDH-A e a atividade da enzima PDK1 (piruvato desidrogenase quinase 1), responsável pela inibição da enzima PDH (*prolyl hydroxylase domain enzyme*) (KIM et al., 2006; LU et al., 2013). Desta forma, HIF-1 α auxilia no desvio do consumo de glicose para a via glicolítica. A atividade do oncogene c-Myc atua em conjunto HIF-1 α para a maior eficiência de glicólise nas células tumorais (KIM et al., 2007).

A via de fosfoinosítídeo 3-fosfato quinase (PI3K), classicamente associada à sobrevivência e crescimento celular, possui sua atividade aumentada em células tumorais (HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009). Esta via tem como principais efetores, Akt e mTOR, e está envolvida no metabolismo destas células sendo associada ao aumento da glicólise aeróbica e da produção de lactato, além da regulação positiva da expressão de HIF-1 α (DeBERARDINIS et al., 2008; ELSTROM et al., 2004;).

O lactato como produto final da glicólise, é liberado pelas células tumorais pelos canais transportadores de monocarboxilato (MCT). Esses canais transmembranares estão presentes em diferentes tipos celulares e controlam a entrada e a saída de lactato, dependendo do gradiente de concentração entre o meio extracelular e intracelular (HALESTRAP; PRICE, 1999). Os MCTs são canais dependentes de prótons, portanto para o transporte de lactato são também necessários íons H⁺. Já sua expressão e localização na membrana plasmática está associada à chaperona CD147 (KIRK et al., 2000). Existem mais de nove tipos de MCT, porém apenas quatro estão bem descritos na literatura. O MCT-1 é expresso pela maioria dos tipos celulares, sendo responsável pela captação de lactato. Assim, como o MCT-1, o MCT-2 apesar de expresso apenas em alguns tipos celulares, também está envolvido na captação de lactato. Já o MCT-4 está mais associado a células com alta capacidade glicolítica, sendo responsável pelo transporte de lactato do meio intracelular para o extracelular. Enquanto o MCT-3 está presente apenas no epitélio pigmentar da retina (HALESTRAP, PRICE, 1999). Recentemente foi descrito um receptor de lactato presente na membrana plasmática (LIU et al., 2009). O receptor denominado GPR81 é um receptor acoplado a proteína G, e está presente no tecido adiposo e cerebral e também é expresso por diversas células tumorais e imunes. Em células tumorais, a sinalização por GPR81 aumenta a expressão de genes envolvidos no metabolismo do lactato, como os MCTs (ROLAND et al.,

2014). Já em macrófagos é necessário para mediar os efeitos do lactato nessas células (HOQUE et al., 2014).

Apesar de aparentemente ser apenas um produto de refugo da via glicolítica, o lactato tem papel relevante no microambiente tumoral, estando relacionado à progressão tumoral e a maior incidência de metástases (WALENTA et al., 1997, 2000a). Dentro do ambiente tumoral, as células tumorais podem adquirir diferentes fenótipos energéticos, dependendo da vascularização e oxigenação. Nas zonas pouco vascularizadas ocorre grande consumo de glicose e utilização da via glicolítica, já em zonas bem vascularizadas, além de glicose, pode ocorrer o consumo alternativo de outras fontes energéticas, como o lactato (HENSLEY et al., 2016). Portanto, o lactato pode ser uma importante fonte energética para as células tumorais e também para o infiltrado inflamatório. O acúmulo de lactato no microambiente tumoral ocasiona a acidificação do pH, o que está relacionado com o aumento da expressão de fatores pró-angiogênicos e supressão da resposta imune (FUKUMURA et al., 2001; LARDNER, 2001).

O lactato está relacionado ao fenótipo pró-tumoral de diversas células imunes associadas ao tumor. O lactato inibe a maturação de células dendríticas (GOTTFRIED et al., 2006), a secreção de TNF- α por monócitos, além de retardar a expressão de diferentes fatores pró-inflamatórios nessas células (DIETL et al., 2010; PETER et al., 2015), diminui a atividade citotóxica de linfócitos T e células NK (FISCHER et al., 2007; HUSAIN et al., 2014) e favorece o desenvolvimento de células mielóides supressoras (HUSAIN et al., 2013). Lactato também está envolvido no favorecimento da via IL-23/IL-17 em células imunes tumorais, favorecendo um perfil de ativação Th17 invés de Th1 (SHIME et al., 2008).

Em macrófagos, o lactato está envolvido no aumento da secreção de IL-6 e IL-8, importantes fatores pró-tumorais (SAMUVEL et al., 2009), promove a diferenciação de macrófagos do tipo M2 associados a células-tronco mesenquimais (SELLERI et al., 2016). Em macrófagos associados ao tumor (TAM), o lactato promove um fenótipo M2 via a estabilização de HIF-1 α com aumento da expressão de arginase 1 e VEGF (COLEGIO et al., 2014), e redução da atividade de iNOS e NF- κ B, além de promover a migração de macrófagos (ZHAO et al., 2015a). Em pacientes com câncer cervical, a maior produção de lactato está correlacionada a um pior prognóstico (WALENTA et al., 2000). Além disso, com a progressão das lesões uterinas ao câncer do colo uterino, é observado um aumento na expressão dos canais transportadores de monocarboxilato (MCT) (PINHEIRO et al., 2008).

O lactato atua como um inibidor da resposta imune anti-tumoral e favorece a progressão tumoral. No entanto, seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado, tampouco seu efeito em macrófagos humanos associados ao tumor. No contexto de câncer cervical, não há qualquer estudo relacionando o papel do lactato secretado pelas células tumorais na modulação do fenótipo de macrófagos. Desta forma, nosso estudo é importante para aprofundar o conhecimento sobre os efeitos do lactato em macrófagos humanos no contexto tumoral. O entendimento do papel desse metabólito pode consistir em um possível alvo terapêutico, através do bloqueio de sua produção ou captação.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar como o lactato secretado por linhagens celulares derivadas de câncer do colo uterino modulam o fenótipo de macrófagos humanos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o fenótipo de macrófagos humanos em um ambiente de co-cultura tridimensional com linhagens celulares derivadas de câncer do colo uterino;
- Avaliar parâmetros metabólicos nas células tumorais e nos macrófagos em co-cultura;
- Avaliar o efeito do bloqueio da enzima lactato desidrogenase nas células tumorais no fenótipo dos macrófagos;
- Determinar quais vias de sinalização e fatores de transcrição estão envolvidos na modulação do fenótipo dos macrófagos pelo lactato,
- Avaliar diretamente o efeito do lactato em macrófagos diferenciados *in vitro*.

3 METODOLOGIA

3.1 Cultura de esferoides tumorais

As linhagens de células tumorais, HeLa e SW756 (com genoma de HPV18), SiHa e CasKi (com genoma de HPV16) e C33 (negativa para HPV, com mutação em p53) (CROOK; WREDE; VOUSDEN, 1991; FREEDMAN et al, 1982; YEE et al., 1985), comercialmente disponíveis na *American Type Culture Collection* (ATCC), foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (daqui para frente denominado R10) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 5 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 1% de glutamina (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA). As células foram mantidas em incubadora umidificada a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Ao atingirem confluência desejada para subcultura, as células foram lavadas com PBS contendo 0,05 mM EDTA e tratadas com solução de 0,25% tripsina/EDTA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

Para a formação de esferoides tumorais, as células foram soltas do substrato por digestão com tripsina, contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em uma placa de cultura de 96 cavidades “fundo U” coberta com 1% de agarose/PBS. A quantidade de células semeadas variou conforme as características de cada linhagem, sendo 5.000 células/cavidade para HeLa, SiHa e SW756 e 15.000 células/cavidade para C33 e CasKi, conforme detalhada na seção Resultados. Após o plaqueamento, as culturas foram centrifugadas e incubadas durante quatro dias. Com a formação dos esferoides de células tumorais, metade do meio foi retirada e a mesma quantidade, contendo uma suspensão de monócitos humanos foi adicionada. As co-culturas foram incubadas por mais seis dias (totalizando dez dias de incubação), a fim de permitir a diferenciação dos monócitos em macrófagos.

3.2 Isolamento de monócitos humanos

Doadores saudáveis do sexo feminino foram selecionados, conforme consentimento formal (Comitê de Ética em Pesquisa ICB/USP, processo nº 1146), para a coleta de sangue periférico. Critérios de exclusão: gravidez, imunodeficiência de qualquer tipo, não concordância da assinatura do termo de consentimento informado.

O sangue coletado foi submetido a uma separação inicial de células mononucleares (PBMC) através de gradiente de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) e posterior isolamento de monócitos.

Para isolamento de células mononucleares, o sangue foi diluído em PBS na proporção 1:1, e esta mistura foi adicionada a um volume, relativo ao volume inicial de sangue, de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). O material foi centrifugado a 400 g, durante 40 minutos a 20 °C, com a aceleração e a desaceleração desligadas. A camada de células mononucleares obtidas pelo gradiente foi retirada e transferida para um novo tubo cônico, onde foi adicionado quatro vezes o volume das células obtidas de meio de cultura sem soro. As células foram sedimentadas por centrifugação a 1200 rpm, durante 10 minutos a 4 °C. Esse processo foi repetido e as células foram ressuspensas em meio de cultura R10 para quantificação com auxílio da câmara de Neubauer. As células mononucleares obtidas foram submetidas ao isolamento de monócitos por seleção negativa utilizando esferas magnéticas conjugadas do *Pan Monocyte Isolation Kit* (Miltenyi Biotec) e colunas *MACS Column VS/LS* (MACS Miltenyi Biotec Inc, GE), segundo protocolo do fabricante.

3.3 Cultura de macrófagos derivados de monócitos

Monócitos isolados de doadores saudáveis por aderência ou por separação magnética foram cultivados em placas de 24 cavidades com 5% de soro humano AB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) durante seis dias para permitir a diferenciação em macrófagos. Para o cultivo por aderência, um milhão e meio de células mononucleares (PBMC) foram adicionadas por cavidade e incubadas com meio RPMI sem soro durante uma hora. As cavidades foram lavadas até cinco vezes para a remoção das células não aderidas, rendendo cerca de 200.000 monócitos por cavidade. Para o cultivo de monócitos isolados por separação magnética, 300.000 monócitos foram plaqueados por cavidade.

Os monócitos foram diferenciados em macrófagos apenas com soro humano (M0), ou com adição de 10 ng/mL de IL-6 recombinante humana e 10 ng/mL de IFN- γ recombinante humana (M1), ou com adição de 20 ng/mL de IL-4 recombinante humana (M2). Em algumas condições experimentais, os monócitos também foram tratados com 5 ou 10 mM de lactato sódico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O soro, as

citocinas (Peprotech, Rocky Hill, NJ) e o lactato foram adicionadas no dia zero e repostos no terceiro dia de cultura.

3.4 Avaliação da expressão de moléculas de superfície nos macrófagos

Os esferoides foram coletados da placa de cultura após a incubação de dez dias e cinco esferoides de cada condição foram reunidos no mesmo tubo, sedimentados e o sobrenadante removido. Para a dissociação dos esferoides, foram adicionados 65 μ L da enzima Accutase na concentração de 1X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) por tubo, seguida de incubação no equipamento *Thermomixer* (Eppendorf, Alemanha) a 37 °C, 1250 rpm de agitação, por 5 minutos. A ação da enzima foi neutralizada com MTH (Hanks 1 X, suplementado com 15 mmol/L de HEPES pH 7.4, 0,5 U/mL DNase e 5% soro fetal bovino) e temperatura baixa (4 °C). A suspensão celular foi contada em câmara de Neubauer com o corante vital, azul de Trypan.

Os macrófagos derivados de monócitos foram retirados da placa com auxílio de um *cell scraper*.

A expressão de moléculas de superfície em macrófagos foi avaliada por citometria de fluxo. Primeiramente, os receptores celulares para cadeia Fc foram bloqueados com Fc Block (1:100) (eBiosciences) por 10 minutos e em seguida, o coquetel de anticorpos (Tabela 1) foi adicionado sobre as células e incubado por mais 20 minutos. As células foram lavadas e avaliadas por citometria de fluxo em FACSCanto II (BD Biosciences).

Tabela 1 – Anticorpos utilizados para a análise de moléculas de superfície de macrófagos

Anticorpo	Função	Fluorescência	Titulação	Marca
anti-CD45	Antígeno comum de leucócitos	AmCyan	1:100	BD Biosciences
anti-CD14	Co-receptor de LPS	APC	1:25	BD Biosciences
anti-CD206	Receptor de manose	FITC	1:25	BD Biosciences
anti-CD16	Receptor de IgG Fc γ RIII	PE	1:100	BD Biosciences
anti-CD64	Receptor de IgG Fc γ RI	PE-Cy5	1:100	BD Biosciences
anti-CD86	Molécula co-estimuladora	PE-Cy7	1:100	BD Biosciences
anti-HLA-DR	MHC de classe II	APC-Cy7	1:200	BD Biosciences

3.5 Avaliação das citocinas produzidas pelos macrófagos

Os sobrenadantes dos esferoides de co-culturas, dos esferoides apenas com células tumorais e dos macrófagos derivados de monócitos, foram coletados no momento do processamento das células para marcação com anticorpos e análise por citometria de fluxo. Estes foram armazenados a -20 °C até o momento da avaliação de concentração de citocinas. As citocinas foram avaliadas por CBA (BD™ Cytometric Bead Array (CBA) - Human Inflammatory Cytokine Kit - BD Biosciences), utilizando FACSCantoII (BD Biosciences). A análise da expressão das citocinas foi realizada no programa FCAP Array™ (BD Biosciences). O limite de detecção para as citocinas avaliadas, de acordo com o manual do fabricante é: 3,4 pg/mL para IL-8; 7,2 pg/mL para IL-1 β ; 2,5 pg/mL para IL-6; 3,3 pg/mL para IL-10; 3,7 pg/mL para TNF- α e 1,9 pg/mL para IL-12.

3.6 Curva de dose de inibidores metabólicos

Os esferoides de três dias foram tratados com diferentes concentrações de oxamato, inibidor da enzima lactato desidrogenase, ou de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHC), inibidor do canal transportador de monocarboxilato-1 (MCT-1) e incubados por 24 horas. Para avaliar a morte celular, os esferoides foram dissociados e a suspensão celular foi incubada com uma solução de MTH com 0,1 μ M de DAPI, e avaliada por citometria de fluxo. Células positivas para marcação com DAPI foram consideradas mortas. Importante salientar que as linhagens celulares HeLa e CasKi apresentaram morte celular mais elevada na condição controle, quando comparadas com as demais.

As doses escolhidas foram baseadas na citotoxicidade dos inibidores. Para o oxamato optou-se pela dosagem intermediária (80 mM) por não causar mais de 10% de morte celular e ser uma dose mais comumente utilizada (GOTTFRIED et al, 2006) (Figura 2).

Figura 2 – Curva de dose de oxamato em esferoides de linhagens celulares de câncer do colo uterino.

As doses de oxamato indicadas foram adicionadas aos esferoides de três dias. Após 24 horas de incubação, os esferoides foram dissociados e as células foram incubadas com 0,1 μ M de DAPI e a morte celular foi avaliada por citometria de fluxo. Gráficos mostram média e erro padrão da média de três experimentos independentes.

Para o inibidor CHC, optou-se pela dose de 2 mM por apresentar menor morte celular para a maioria das linhagens celular, do que a dose mais alta, 4 mM (Figura 3).

Figura 3 – Ensaio dose-resposta de CHC sobre a viabilidade de linhagens celulares derivadas de câncer cervical.

As doses indicadas de CHC foram adicionadas aos esferoides de três dias. Após 24 horas de incubação, os esferoides foram dissociados e as células foram incubadas com 0,1 μ M de DAPI e a morte celular foi avaliada por citometria de fluxo. Gráficos mostram média e erro padrão da média de três experimentos.

* $p < 0,05$, segundo teste de Tukey.

3.7 Tratamento com inibidores

Os esferoides de três dias foram lavados e tratados com 80 mM do inibidor oxamato por 24 horas. Após esse período, estes foram lavados para remover o oxamato, meio fresco foi adicionado e caso necessário, a placa foi centrifugada para os esferoides voltarem a sua conformação.

Para o tratamento com o inibidor CHC, os esferoides foram incubados até o quarto dia sem nenhuma lavagem e os monócitos isolados foram pré-incubados por 15 minutos com 2 mM do inibidor. Após esse período, os monócitos foram adicionados aos esferoides juntamente com o inibidor e incubados por seis dias (Figura 4).

Figura 4 - Esquema de tratamento de esferoides tumorais com inibidores de metabolismo.

(A) Tratamento com 80 mM de oxamato, inibidor da enzima lactato desidrogenase. (B) Tratamento com 2 mM de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHC), inibidor do canal transportador de monocarboxilato-1 (MCT-1).

3.8 Quantificação de lactato e de glicose

Esferoides contendo apenas células tumorais, com três dias de incubação foram lavados e incubados com novo meio de cultura, contendo ou não o inibidor oxamato. Após 24 horas de incubação o sobrenadante dos esferoides foi coletado e armazenado a -20°C até a análise. Para a quantificação, o sobrenadante de três esferoides por

experimento foi combinado para detecção no analisador bioquímico YSI 2700 Select (YSI LifeSciences, Ohio, US), gentilmente cedido pelo Prof. Aldo Tonso, em parceria com o Laboratório de Imunologia Viral (LCA) do Instituto Butantan.

3.9 Ensaio de proliferação de linfócitos T

Macrófagos foram isolados de esferoides de co-cultura por esferas magnéticas ligadas a anticorpos anti-CD45 (Miltenyi Biotec), contados e plaqueados em placas de 96-cavidades fundo reto. Linfócitos T foram isolados de doadores saudáveis alogênicos por *beads* magnéticas pelo *Pan T Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec). Os linfócitos T foram incubados com o corante vital Cell Proliferation Dye eFluor® 450 (eBioscience, Inc., San Diego, CA, EUA), conforme o protocolo do fabricante, e 100.000 linfócitos foram plaqueados com diferentes proporções de macrófagos (10 linfócitos para 1 macrófago, 5 linfócitos para 1 macrófago, 2 linfócitos para 1 macrófago). Uma solução de fitohemaglutinina 1:800 foi adicionada ao meio de cultura como estímulo mitogênico aos linfócitos T. A concentração utilizada foi determinada em uma curva de dose-resposta para proliferação celular, sendo capaz de estimular no máximo 50% dos linfócitos tratados com a mesma. A placa foi incubada por quatro dias para determinação da proliferação linfocitária, pela diluição do corante vital e a expressão de marcadores de ativação, ambas avaliadas por citometria de fluxo.

3.10 Avaliação das citocinas produzidas por linfócitos

O sobrenadante do ensaio de proliferação de linfócitos T foi coletado e armazenado a -20°C para posterior dosagem de citocinas. Para a dosagem foi utilizada o sobrenadante das culturas de razão 1:2 (1 macrófago para 2 linfócitos), por ser a condição onde foi observada maior diferença na proliferação de linfócitos T. A dosagem foi realizada por CBA (BD™ Cytometric Bead Array (CBA) - Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit - BD Biosciences), utilizando FACSCantoII (BD Biosciences) e a análise da expressão das citocinas foi efetuada no programa FCAP Array™ (BD Biosciences).

3.11 Avaliação de vias de sinalização nos macrófagos

As células das frações CD45-negativa (células tumorais) e CD45-positiva (macrófagos) dos esferoides, obtidas conforme descrito anteriormente, bem como os macrófagos derivados de monócitos foram sedimentados e lavados duas vezes com PBS para posterior lise celular. Para isto, foi utilizado o tampão RIPA (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂ EDTA, 1 mM EGTA, 1% Nonidet P-40, 1% desoxicólico sódico) suplementado com coquetéis comerciais de inibidores de protease e de fosfatase para células de mamíferos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os lisados celulares foram centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes transferidos para novos tubos e armazenados a -20 °C.

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando-se o kit comercial *Biorad protein assay* (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Um gel de 10% poliacrilamida foi utilizado para fracionamento de 25 µg de proteínas. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF para a posterior sondagem com os anticorpos contra as proteínas totais e fosforiladas de NF-κB, IκB, STAT3 e Akt (BioLegend, San Diego, CA, EUA). A expressão das proteínas foi quantificada pelo programa ImageJ e a normalização foi realizada pela razão entre a proteína de interesse e a expressão da proteína constitutiva, Cofilina. A proteína Cofilina foi utilizada por apresentar baixo peso molecular (18 KDA) e assim proporcionar a utilização de uma fração da membrana não destinada as proteínas de interesse.

3.12 Análise Estatística

Os resultados das análises dos diferentes parâmetros avaliados em diferentes condições experimentais, em conjunto, foram testados por ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. Comparações entre parâmetros avaliados em pares experimentais foram realizada por teste T. Os testes estatísticos e gráficos foram efetuados no programa GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA). Em todos os casos, foi considerada como hipótese correta quando valores de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Padronização dos esferoides tumorais

Para estudar a interação entre células tumorais e macrófagos humanos, foram estabelecidas culturas tridimensionais de células tumorais, denominadas esferoides tumorais. Os esferoides tumorais mimetizam diferentes características presentes em tumores, tais como centro necrótico e aumento da expressão de genes glicolíticos (WENZEL et al., 2014). Sendo, deste modo, um modelo de co-cultura mais fiel do que culturas bidimensionais, especialmente para o estudo do metabolismo tumoral.

Para formar os esferoides tumorais, primeiramente foi necessário estimar a quantidade adequada de células para cada linhagem celular, visto que cada uma apresenta morfologia e taxa de crescimento diferenciada. A princípio, o objetivo foi desenvolver esferoides com um tamanho semelhante entre as linhagens, porém cada linhagem celular se organiza diferentemente nos esferoides, ou seja, algumas formam estruturas mais densas e circulares, enquanto outras tendem a formar estruturas mais elipsoides. Acreditamos, porém, que este não seja um fator limitante desta metodologia e reflita apenas a diferença biológica de cada célula (Figura 5 e Tabela 2).

As linhagens HeLa, SiHa e SW756 se comportam de maneira semelhante, deste modo foi possível utilizar a mesma quantidade de células para a geração dos esferoides destas linhagens (5.000 células por esferoide). Já as células da linhagem C33 apresentam tamanho menor com relação às anteriores e quando a mesma quantidade de células era utilizada, os esferoides não ficavam densos, apresentando pequenos buracos. Desta forma, a adição de um número três vezes maior (15.000 células por esferoide), resultou em esferoides mais densos. De mesmo modo, para a geração de esferoides da linhagem CasKi, também foi necessário utilizar uma maior quantidade de células (15.000 células por esferoide). Porém por um motivo diferente: esta linhagem apresenta menor taxa de proliferação; logo, quando utilizada em menor quantidade (5.000 células por esferoide), forma um esferoide muito pequeno que não resiste durante todo o período de incubação.

Figura 5 – Esferoides de linhagens celulares de câncer do colo uterino.

Imagem de microscopia obtida em microscópio de contraste de fase. À esquerda, células aderidas em monocamada e à direita as mesmas células formando esferoides, após quatro dias de incubação. Para a geração dos esferoides tumorais, 5×10^3 de células HeLa, SiHa e SW756 e 15×10^3 de células CasKi e C33 foram cultivadas sobre um colchão 1% de agarose em placa de 96 cavidades por quatro dias em meio 10% FBS/RPMI. (A) HeLa (B) SW756 (C) SiHa (D) CasKi (E) C33. Barra = 20 μm. Aumento: 400 x.

Tabela 2 – Número de células em esferoides tumorais de quatro dias.

Linagem celular	Células viáveis (média $\pm$ erro padrão)	Células mortas (média $\pm$ erro padrão)	% células mortas (média)
HeLa	22.000 $\pm$ 2.817	3.667 $\pm$ 795	14,29
SW756	27.750 $\pm$ 2.983	417 $\pm$ 83	1,48
SiHa	26.833 $\pm$ 1.878	1.167 $\pm$ 83	4,17
CasKi	6.333 $\pm$ 1.228	1.125 $\pm$ 625	15,08
C33	43.083 $\pm$ 2.073	1.000 $\pm$ 250	2,27

4.2 Infiltrado de macrófagos em esferoides tumorais de câncer do colo uterino

Com a padronização da técnica para a formação dos esferoides tumorais, monócitos humanos de doadores saudáveis foram adicionados aos esferoides tumorais de quatro dias. Inicialmente, após 24 horas, foi possível observar que os monócitos migraram para o interior dos esferoides das linhagens associadas ao HPV, deixando-os com aspecto bem denso. Já nos esferoides da linhagem negativa para HPV, C33, os monócitos se agruparam nas bordas dos mesmos (Figura 6).

Figura 6 – Esferoides de linhagens celulares de câncer do colo uterino após a adição de monócitos humanos.

Após quatro dias de incubação $6,5 \times 10^4$ monócitos humanos isolados de doadores saudáveis foram marcados com CFSE (verde) e adicionados aos esferoides tumorais. Imagens adquiridas no microscópio invertido Nikon Eclipse Ti-E após 24 horas da adição dos monócitos. Aumento: 400 x. Sobreposição das imagens realizada pelo programa ImageJ (A) HeLa (B) C33.

Após seis dias de co-cultura, período no qual, os monócitos se diferenciaram em macrófagos, os esferoides foram coletados e dissociados para análise por citometria de

fluxo (Figura 7). Primeiramente, notou-se uma diferença na quantidade de macrófagos ao final do período de incubação, onde os esferoides de linhagens tumorais positivas para HPV apresentaram recrutamento de monócitos significativamente maior do que a linhagem HPV negativa (Figura 8 A-B). Para identificar como as células tumorais modulam o fenótipo desses macrófagos, foram utilizados anticorpos para marcadores classicamente associados a macrófagos do tipo M1 (CD64, CD86, HLA-DR) e do tipo M2 (CD206, CD16) (AMBARUS et al., 2012).

Figura 7 – Estratégia de análise da população de macrófagos presente nos esferoides tumorais.

Primeiramente foi definida a população por parâmetros de granulosidade e tamanho - SSC-A e FSC-A (1), em seguida foi realizada a exclusão de células duplas (2), a definição da população CD45 positiva (3) e da população CD14 positiva dentro da população CD45 positiva (4). A partir do último *gate* foi avaliada a expressão dos demais marcadores de superfície. Cerca de 100.000 eventos foram adquiridos por amostra em FACSCanto II (BD Biosciences).

Macrófagos associados aos esferoides de linhagens celulares positivas para HPV apresentaram fenótipo misto, ou seja, os mesmos expressaram marcadores tanto de fenótipo do tipo M1 quanto do tipo M2 (Figura 8 C-D e 9). Já os macrófagos associados aos esferoides da linhagem negativa para HPV (C33), expressaram em menor intensidade todos os marcadores analisados e provavelmente não completaram a diferenciação em macrófagos. Além disso, o marcador CD206 é mais expresso em macrófagos do tipo M2, indicando que os macrófagos de C33 apresentaram menos

características desse fenótipo (Figura 8 C-D e 9). Macrófagos diferenciados sem contato com células tumorais, diretamente na placa contendo agarose, apresentaram um perfil de expressão de marcadores de superfície mais semelhante aos macrófagos associados a linhagem HPV negativa, porém apresentaram maior expressão de CD206. Isto indica que as linhagens tumorais foram capazes de modular os macrófagos associadas a estas.

Figura 8 – Infiltrado inflamatório em esferoides de linhagens celulares de câncer do colo uterino.

Para a geração de esferoides tumorais, 5×10^3 de células HeLa, SiHa e SW756 e 15×10^3 de células CasKi e C33 foram cultivadas em 1% de agarose em placa de 96 cavidades. Após quatro dias de incubação, $6,5 \times 10^4$ monócitos humanos isolados de doadores saudáveis foram adicionados. As co-culturas foram coletadas após seis dias, dissociadas e marcadas com anticorpos contra os marcadores indicados e analisados por citometria de fluxo. MO: monócitos cultivados diretamente em agarose para diferenciação em macrófagos sem contato com células tumorais. Duzentos mil monócitos foram adicionados as cavidades da placa de 96 cavidades para incubação por seis dias. (A) Frequência de células CD45⁺ nos esferoides tumorais indicados. (B) Gráficos representativos da expressão de CD45 nos esferoides tumorais indicados. (C) Frequência das populações indicadas contidas nas células CD45⁺. (D) Expressão de cada molécula avaliada indicada pela intensidade de fluorescência mediana (MFI) na população CD45⁺CD14⁺. Gráficos mostram média e erro padrão da média de pelo menos cinco experimentos. $p < **0,001$ $p < ***0,0001$, segundo teste de Tukey.

Figura 9 – Gráficos representativos da expressão de marcadores de superfície em macrófagos associados a esferoides de linhagens tumorais de câncer cervical

Para a geração de esferoides tumorais, 5×10^3 de células SW756 e 15×10^3 de células C33 foram cultivadas em 1% de agarose em placa de 96 cavidades. Após quatro dias de incubação, $6,5 \times 10^4$ monócitos humanos isolados de doadores saudáveis foram adicionados. As co-culturas foram coletadas após seis dias, dissociadas e marcadas com anticorpos contra os marcadores indicados e analisados por citometria de fluxo. Gráficos representativos da expressão de marcadores de superfície em macrófagos associados aos esferoides de SW756 e de C33. UN: amostra não corada.

Para confirmar que o observado na linhagem negativa para HPV não era devido ao diferente número de células utilizadas para a formação dos esferoides de C33 e CasKi, também foram produzidos esferoides contendo menores quantidades de células tumorais C33. O resultado observado foi semelhante ao que observamos anteriormente (Figura 10).

Figura 10 - Infiltrado inflamatório em esferoides da linhagem celular C33 com diferentes quantidades de células.

Foram gerados esferoides da linhagem C33 com diferentes números de células (5×10^3 , $6,5 \times 10^3$, 15×10^3 e 20×10^3) e no quarto dia da formação destes esferoides, a mesma quantidade (65×10^4) de monócitos foi adicionada. As co-culturas foram coletadas após seis dias, dissociadas e marcadas com anticorpos contra os marcadores indicados e analisados por citometria de fluxo. Histogramas mostram porcentagem de células CD14 positivas nos esferoides e dot-plots mostram porcentagem de células expressando duplamente os marcadores CD14CD86 e CD14CD206. Como controle, estão representados esferoides de C33 sem adição de monócitos (sem MO) e de CasKi (15×10^3 células/esferoide) com adição de monócitos.

4.2.1 Produção de citocinas pelos macrófagos tumorais

Os macrófagos associados a células tumorais positivas para HPV apresentaram maior produção de citocinas pró-tumorais (IL-10, IL-6 e IL-8), enquanto os associados à célula tumoral negativa para HPV, secretaram essas citocinas em menor quantidade, além de secretarem a citocina pró-inflamatória IL-1 β (Figura 11). A produção de IL-10 e de IL-1 β nos esferoides pode ser atribuída exclusivamente aos macrófagos, uma vez que estas citocinas não foram detectadas nos esferoides contendo apenas células

tumorais. Já as citocinas IL-6 e IL-8 foram também produzidas pelas células tumorais e em alguns casos sua produção foi mais elevada nos esferoides em co-cultura, indicando que os macrófagos também secretaram estas ou que os mesmos modularam positivamente a secreção de citocinas pelas células tumorais. As concentrações determinadas para as citocinas TNF- α e IL-12 estavam abaixo do limite de detecção do kit e por isso não foram incluídas nessa análise.

Figura 11 – Citocinas secretadas por macrófagos cultivados em esferoides tumorais de linhagens celulares de câncer do colo uterino

Os sobrenadantes das co-culturas foram coletados após o período de diferenciação dos macrófagos (6 dias de cultura de células tumorais e monócitos) e analisados por CBA (BD™ Cytometric Bead Array (CBA) - Human Inflammatory Cytokine Kit - BD Biosciences). Devido ao diferente número de células nos esferoides das diferentes linhagens celulares, os valores representados pela concentração de citocinas em pg/mL foram divididos pelo número de células vivas divididas por 10⁴. O sinal positivo indica que estes esferoides são de co-cultura, enquanto o negativo que estes esferoides são apenas de células tumorais. MO: monócitos cultivados diretamente em agarose para diferenciação em macrófagos sem contato com células tumorais. Duzentos mil monócitos foram adicionados as cavidades da placa de 96 cavidades para incubação por seis dias. Nos gráficos das citocinas IL-10 e IL-1 β , a dosagem nos esferoides de C33 é significativamente diferente comparado aos demais esferoides de co-cultura. Gráficos mostram média e erro padrão da média de quatro experimentos independentes. *p<0,05, **p<0,001, ***p<0,001, segundo teste de Tukey.

4.2.2 Viabilidade celular das células tumorais nos esferoides

Macrófagos associados ao tumor (TAM) geralmente possuem atividades pró-tumorais, auxiliando na manutenção e crescimento tumoral. Deste modo, foi observado que a presença de macrófagos nos esferoides das linhagens tumorais associadas ao HPV, promoveu viabilidade significativamente maior das células tumorais em co-cultura do que as cultivadas sozinhas. Ao contrário, nos esferoides da linhagem negativa para HPV, a presença de macrófagos levou a viabilidade celular significativamente menor nas células em co-cultura. (Figura 12).

Figura 12 – Viabilidade celular dos esferoides tumorais de linhagens celulares de câncer do colo uterino.

Após os seis dias de co-cultura, os esferoides foram coletados, dissociados e contados com azul de Trypan, para avaliação do número total de células e viabilidade celular. Nos esferoides de co-cultura, o número de células foi descontado da média de células CD45 positivas, determinado por citometria de fluxo, como indicado na figura 3. Os resultados são representados pela razão entre o número de células dos esferoides de co-cultura e dos esferoides somente com células tumorais. $p < **0.001$, $p < ***0.0001$, segundo teste-T.

A análise do ciclo celular das células tumorais de esferoides contendo apenas células tumorais ou de co-cultura, relevou que os macrófagos associados a linhagem celular positiva para HPV, SW756, induziram maior proliferação das células tumorais, o que não foi observado na linhagem celular negativa para HPV (Figura 13).

Figura 13 – Proliferação celular nos esferoides das linhagens celulares C33 e SW756.

Após os seis dias de co-cultura, esferoides contendo macrófagos e esferoides contendo apenas células tumorais, foram coletados e dissociados. Para o ciclo celular, as células foram fixadas com 80% de etanol e permeabilizadas, com 0,1% de Triton X-100, para a adição de 1 µg/mL de DAPI. A análise da proliferação celular foi realizada excluindo-se as células em fase sub-G1 (contendo células mortas e a população de macrófagos). A porcentagem de células proliferando contém células em S e G2/M. Sinal positivo indica que estes esferoides são de co-cultura, enquanto o negativo que estes esferoides são apenas de células tumorais. Gráficos mostram média e erro padrão da média de cinco experimentos. Histogramas à direita são representativos de um experimento. **p<0,001, segundo teste-T.

4.3 Efeito do metabolismo tumoral

As linhagens celulares derivadas de câncer cervical positivas para HPV foram capazes de modular o fenótipo de macrófagos para um fenótipo misto com características pró-tumorais, enquanto os macrófagos associados a linhagem celular negativa para HPV apresentaram características anti-tumorais. Entre diversos fatores que poderiam ter influência nesses processos, como citocinas e mediadores lipídicos, metabólitos produzidos por células tumorais podem ser um fator importante.

O metabolismo tumoral alterado leva a uma maior produção de lactato pelas células tumorais (HIRSCHHAEUSER; SATTTLER; MUELLER-KLIESER, 2011). Em esferoides tumorais, a produção de lactato pode variar de 2,4 mM a 14,5 mM, aumentando com o tempo de cultura (FISCHER et al., 2007). Já em tumores de pacientes essa produção pode chegar até 40 mM (WALENTA et al., 2000a). O lactato

presente no microambiente tumoral pode afetar o fenótipo dos macrófagos associados ao tumor (COLEGIO et al., 2014). Deste modo, primeiramente foi investigada a produção de lactato nos esferoides tumorais (Figura 14). A maior concentração de lactato observada no sobrenadante dos esferoides foi de 3,2 mM no sobrenadante do esferoide de HeLa (Figura 14A). No entanto, quando a concentração de lactato foi dividida pelo número de células presentes nos esferoides, a linhagem celular CasKi foi a maior produtora de lactato por célula, produzindo pelo menos o dobro de lactato que as demais linhagens celulares (Figura 14B).

Figura 14 – Concentração de lactato no sobrenadante de esferoides de linhagens celulares de câncer do colo uterino.

O sobrenadante de esferoides de quatro dias foi coletado para detecção de lactato pelo analisador bioquímico YSI 2700. Os esferoides foram lavados e receberam meio novo 24 horas antes da dosagem ser realizada. (A) Concentração total de lactato no sobrenadante dos esferoides das linhagens celulares indicadas. (B) Concentração de lactato no sobrenadante dos esferoides dividido pelo número de células multiplicado por mil. A concentração de lactato em CasKi foi significativamente diferente ($p < 0,0001$) de todas as outras linhagens celulares. Resultados mostram média e erro padrão da média de quatro experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$, segundo teste de Tukey.

4.3.1 Efeito da inibição de LDH no metabolismo das células tumorais

Lactato, como mencionado anteriormente, é um produto da glicólise, em um processo desencadeado pela conversão de piruvato pela enzima lactato desidrogenase (LDH). Oxamato é um inibidor competitivo dessa enzima e sua utilização já é bem estabelecida (ZHAO et al., 2015b). Com a inibição de LDH por oxamato foi observada redução significativa da produção de lactato nos esferoides das linhagens celulares SW756 e C33, mas não nas demais linhagens (Figura 15A). Concomitantemente à

redução da produção de lactato nos esferoides tratados com oxamato, houve uma redução no consumo de glicose pelas células tumorais, sendo a mesma significativa para a linhagem celular C33 (Figura 15B). A redução do consumo da glicose foi indicada pelo aumento da concentração desta no meio de cultura, uma vez que, a glicose presente no meio foi menos consumida.

Figura 15 – Efeito do inibidor oxamato na produção de lactato e no consumo de glicose em esferoides de linhagens celulares de câncer do colo uterino.

O sobrenadante de esferoides de quatro dias foi coletado para detecção simultânea de lactato e glicose pelo analisador bioquímico YSI 2700. Os esferoides foram lavados e receberam meio novo com ou sem oxamato 24 horas antes da dosagem ser realizada. (A) Razão entre a concentração de lactato no sobrenadante de esferoides tratados com oxamato e esferoides controle. (B) Razão entre o consumo de glicose entre esferoides tratados com oxamato e esferoides controle. * $p < 0,05$, segundo teste-T.

As células tumorais apresentam mudanças no metabolismo celular, com elevado consumo de glicose e aumento de produção de ácido láctico pela via glicolítica (DeBERARDINIS et al., 2008). Para observar a relação entre o consumo de glicose e a liberação de lactato pelas células tumorais, os dados de quantificação de lactato e de glicose foram utilizados para uma análise de correlação (Figura 16). As medidas de lactato e de glicose nos esferoides controle e tratados com oxamato foram reunidas para essa análise e foram identificadas nos gráficos apresentados na Figura 16. Se as medidas fossem utilizadas separadamente, os resultados de correlação seriam os mesmos.

Para as linhagens celulares positivas para HPV, quanto maior a concentração de lactato no sobrenadante dos esferoides, menor o consumo de glicose. Já a linhagem celular negativa para HPV possui uma correlação inversa, quanto maior a concentração de lactato maior o consumo de glicose, indicando possivelmente uma maior

dependência da via glicolítica. De fato, quando a via glicolítica foi inibida pelo inibidor 3-bromopiruvato, ocorreu uma elevada morte celular da linhagem C33 (Figura 17).

Figura 16 – Correlação entre o consumo de glicose e a produção de lactato em esferoides de linhagens celulares de câncer do colo uterino.

O sobrenadante de esferoides de quatro dias foi coletado para detecção simultânea de lactato e glicose pelo analisador bioquímico YSI 2700. Os esferoides foram lavados e receberam meio novo com ou sem oxamato 24 horas antes da dosagem ser realizada. Os mesmos valores das dosagens de glicose e lactato da Figura 15 foram utilizados para a análise de correlação. Os valores das condições controle e tratamento com oxamato foram utilizados para essa análise, onde o círculo preenchido equivale à condição controle e o círculo aberto à condição tratamento com oxamato.

Figura 17 – Bloqueio da via glicolítica em esferoides de linhagens celulares de câncer do colo uterino.

Uma dose de 40 μ M de 3-bromopiruvato foi adicionada aos esferoides de três dias. Após 24 horas de incubação, os esferoides foram dissociados e as células foram incubadas com 0,1 μ M de DAPI e a morte celular foi avaliada por citometria de fluxo. O gráfico mostra a porcentagem de células mortas em cultura tratada em relação à cultura controle. A morte celular em C33 foi significativamente maior nas células tratadas ($p < 0,0001$) de todas as outras linhagens celulares. Resultados mostram média e erro padrão da média de três experimentos independentes. *** $p < 0,0001$.

4.3.2 Efeito da inibição da enzima LDH no fenótipo de macrófagos presentes nos esferoides tumorais

Após a caracterização do efeito do bloqueio da produção de lactato nos esferoides de células tumorais, foi investigado o papel desse metabólito sobre o fenótipo de macrófagos. Após a incubação de 24 horas com 80 mM de oxamato, os esferoides foram lavados a fim de remover o inibidor. Deste modo, foi avaliado apenas o efeito do bloqueio da produção de lactato pelas células tumorais e não um possível efeito direto que este inibidor possa ter na diferenciação dos monócitos.

A inibição da produção de lactato não alterou o recrutamento de monócitos para os esferoides tumorais (Figura 18A), porém promoveu alterações no fenótipo dos macrófagos (Figura 18 e 19). Os macrófagos associados aos esferoides das células tumorais positivas para HPV expressaram a mesma frequência dos marcadores avaliados quando comparados com o controle, sem o bloqueio da enzima LDH. No entanto, houve aumento significativo da frequência de macrófagos CD206 e HLA-DR positivos associados aos esferoides da linhagem celular negativa para HPV (Figura 18B). Quando a expressão (MFI) desses marcadores foi avaliada, os macrófagos dos

esferoides de células positivas para HPV tratados com oxamato, apresentaram uma redução da expressão de CD86, CD206, HLA-DR e de CD64 (Figura 19).

Figura 18 – Infiltrado inflamatório em esferoides de linhagens celulares de câncer do colo uterino tratados com inibidor de lactato desidrogenase.

Para a geração de esferoides tumorais, 5×10^3 células HeLa, SiHa e SW756 e 15×10^3 de células CasKi e C33 foram cultivadas sobre um colchão de 1% de agarose em placa de 96 cavidades. Após três dias de incubação, 80 mM de oxamato foram adicionados aos esferoides para incubação por 24 horas. No dia seguinte, os esferoides foram lavados para remoção do oxamato e $6,5 \times 10^4$ monócitos humanos isolados de doadores saudáveis foram adicionados às culturas. As co-culturas foram coletadas após seis dias, dissociadas e marcadas com anticorpos contra os marcadores indicados e analisados por citometria de

fluxo. (A) Frequência de células CD45+ nos esferoides tumorais indicados. (B) Frequência das populações indicadas contidas na população de células CD45+. Gráficos mostram média e erro padrão da média de pelo menos quatro experimentos. Dot-plot representativo da população CD14CD206 nos esferoides de C33. Sinais positivos (+) indicam o tratamento com oxamato enquanto negativos (-) indicam controle. $p < 0,05$, $**p < 0,001$ entre tratado e controle, segundo teste-T.

Figura 19 - Intensidade de fluorescência mediana (MFI) de cada molécula do infiltrado inflamatório

Para a geração de esferoides tumorais, 5×10^3 células HeLa, SiHa e SW756 e 15×10^3 células CasKi e C33 foram cultivadas sobre colchão de 1% de agarose em placa de 96 cavidades. Após três dias de incubação, 80 mM de oxamato foi adicionado aos esferoides para incubação por 24 horas. No dia seguinte, os esferoides foram lavados para remoção do oxamato e $6,5 \times 10^4$ monócitos humanos isolados de doadores saudáveis foram adicionados. As co-culturas foram coletadas após seis dias, dissociadas e marcadas com anticorpos contra os marcadores indicados e analisados por citometria de fluxo. Gráficos de MFI das moléculas indicadas contidas na população CD45+C14+ (esquerda) e histogramas representativos da expressão das moléculas indicadas (direita) (UN (*unstained*) – amostra não marcada). Gráficos mostram média e erro padrão da média de pelo menos quatro experimentos. Sinais positivos (+) indicam o tratamento com oxamato enquanto negativos (-) indicam controle. $p < *0,05$ entre tratado e controle, segundo teste-T.

4.3.3 Efeito do tratamento com oxamato no número de células nos esferoides

O tratamento dos esferoides com o inibidor oxamato promoveu uma diminuição no número total de células nos esferoides de co-cultura de HeLa e de C33 (Figura 20A). Quando o número celular dos esferoides contendo apenas células tumorais foi avaliado, a diminuição de número de células foi observada somente em esferoides de HeLa, enquanto que em esferoides de C33 esta diferença foi perdida (Figura 20B). Isto indica que os macrófagos associados aos esferoides de C33 tratados com oxamato, adquiriram características mais anti-tumorais, levando a uma diminuição do crescimento tumoral.

Figura 20 – Número celular dos esferoides tumorais de linhagens celulares de câncer do colo uterino tratados com oxamato.

Após seis dias de co-cultura, totalizando dez dias de co-cultura (A) ou de cultura apenas de células tumorais, também totalizando dez dias de cultura (B), os esferoides foram coletados, dissociados e contados com azul de Trypan, para viabilidade celular. Sinais positivos (+) indicam o tratamento com oxamato enquanto negativos (-) indicam controle. Gráficos mostram média de quatro experimentos independentes e erro padrão da média. $p < *0,05$; $p < **0,001$; $p < ***0,0001$ entre o número total de células de tratado e controle, segundo teste-T.

4.3.4 Produção de citocinas nos esferoides tratados com oxamato

Uma vez que o lactato está envolvido na alteração da expressão de diferentes marcadores moleculares presentes nos macrófagos tumorais, foi avaliado se este também estaria envolvido na produção de citocinas por estas células. Interessantemente, a inibição da lactato desidrogenase ocasionou uma redução geral das citocinas produzidas nos esferoides tumorais (Figura 21). A inibição da enzima lactato desidrogenase ocasionou uma redução nos níveis de IL-1 β , IL-10, IL-6 (exceto em HeLa) e TNF- α e um aumento de IL-8 nas co-culturas das linhagens positivas para HPV. Os esferoides de C33 não apresentaram alteração da concentração de citocinas após tratamento, exceto pelo aumento da produção de TNF- α . A concentração de IL-12 medida em todos os esferoides foi aproximadamente 10 vezes menor do que o limite de detecção indicado pelo kit CBA, e por isso não foi considerada para essa análise e para as demais.

Figura 21 – Número celular dos esferoides tumorais de linhagens celulares de câncer do colo uterino tratados com oxamato.

Para a geração de esferoides tumorais, 5×10^3 células HeLa, SiHa e SW756 e 15×10^3 de células CasKi e C33 foram cultivadas sobre colchão de 1% de agarose em placa de 96 cavidades. Após três dias de incubação, 80 mM de oxamato foi adicionado aos esferoides para incubação por 24 horas. No dia seguinte, os esferoides foram lavados para remoção do oxamato e $6,5 \times 10^4$ monócitos humanos isolados de doadores saudáveis foram adicionados. Os sobrenadantes das co-culturas foram coletados após o período de diferenciação dos macrófagos e analisados por CBA (BD™ Cytometric Bead Array (CBA) - Human Inflammatory Cytokine Kit - BD Biosciences). Devido ao diferente número de células nos esferoides das diferentes linhagens celulares, os valores representados pela concentração de citocinas em pg/mL foram divididos pelo número de células vivas divididas por 10^4 . Gráficos mostram média e erro padrão da média de triplicatas de quatro experimentos. Sinais negativos (-) indicam controle enquanto positivos (+) indicam o tratamento com oxamato. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$, segundo teste-T.

4.3.5 Ativação de vias de sinalização nos esferoides tumorais

Para esse experimento e os seguintes, que visam caracterizar o mecanismo pelo qual o lactato atua na modulação do fenótipo dos macrófagos tumorais, foram utilizadas apenas as linhagens SW756 e C33. Como observado nos experimentos anteriores, a modulação do fenótipo dos macrófagos foi semelhante entre as linhagens tumorais positivas para HPV e diferiu da negativa, C33. Desta forma, a linhagem SW756 foi selecionada para representar as linhagens HPV-positivas, pois também foi a linhagem celular positiva para HPV que apresentou modulação da produção de lactato com o tratamento por oxamato.

Como foi observado nos experimentos anteriores, o bloqueio da enzima LDH nas células tumorais, promoveu alterações no padrão de expressão de marcadores de superfície e citocinas nos macrófagos. A regulação destes fatores pode ser dependente da ativação e/ou inibição de diferentes vias de sinalização.

A via de NF- κ B regula a proliferação e sobrevivência celular (BEN-NERIAH; KARIN, 2011). Esta via também é responsável pela regulação da expressão de HLA-DR e CD86, além das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 (BISWAS; LEWIS, 2010). A expressão de IL-6 também pode ser regulada pela via de STAT3 que também está envolvida na regulação de IL-10. Deste modo, a via de STAT3 está associada a um perfil de macrófagos do tipo M2 (STAPLES et al., 2007). Assim como NF- κ B, a via de PI3K/Akt também está envolvida na sobrevivência e proliferação celulares (ALTOMARE; TESTA, 2005), além de favorecer a via glicolítica nas células tumorais (ELSTROM et al., 2004). Em macrófagos, está associada a indução de alguns genes associados ao fenótipo M2 (COVARRUBIAS et al., 2016) e dependendo do tipo de Akt pode estar associado ao fenótipo M1 ou M2 (Akt2:M1, Akt1:M2) (COVARRUBIAS; AKSOYLAR; HORNG, 2015). Deste modo, estas vias de sinalização foram avaliadas a fim de determinar sua regulação tanto nas células tumorais tratadas com oxamato quanto nos macrófagos associados a essas células.

O tratamento das células tumorais com o oxamato não alterou significativamente a expressão de nenhuma das vias de sinalização avaliadas nas células tumorais (Figura 22). A via de STAT3 encontra-se mais ativada nos esferoides da linhagem celular SW756 e isto pode ser devido a maior concentração de IL-6 encontrada nestes esferoides. Os macrófagos oriundos de esferoides de SW756 tratados com oxamato apresentaram uma maior ativação de NF- κ B, demonstrado tanto pela maior fosforilação

do próprio NF- κ B quanto de I κ B. Isto indica que a via canônica de NF- κ B pode estar mais ativa nestes macrófagos. Estes macrófagos também apresentaram maior expressão de Akt, que poderia estar envolvido na ativação de NF- κ B (BAI; UENO; VOGT, 2009).

Figura 22 – Vias de sinalização em esferoides de linhagens celulares de câncer do colo uterino tratados com oxamato.

Para a geração de esferoides tumorais, 5×10^3 células SW756 e 15×10^3 células C33 foram cultivadas sobre colchão de 1% de agarose em placa de 96 cavidades. Após três dias de incubação, 80 mM de oxamato foi adicionado aos esferoides para incubação por 24 horas. No dia seguinte, os esferoides foram

lavados para remoção do oxamato e $6,5 \times 10^4$ monócitos humanos isolados de doadores saudáveis foram adicionados. As co-culturas foram coletadas após seis dias, dissociadas e os macrófagos foram isolados novamente por beads magnéticas anti-CD45. As frações CD45-negativas (células tumorais – “tumor”) e as CD45-positivas (macrófagos – “MO”) foram lisadas e 25 µg de proteína foi utilizada para o western blot. À esquerda, radiografias representativas da expressão das proteínas indicadas. À direita, gráficos da quantificação dessas proteínas. A expressão das proteínas foi quantificada pelo programa ImageJ e a normalização foi realizada pela razão entre a proteína de interesse e a expressão de Cofilina. Gráficos demonstram média e desvio padrão da média de três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

4.3.6 Efeito de macrófagos associados aos esferoides na proliferação de linfócitos

Os macrófagos presentes no microambiente tumoral participam de mecanismos de evasão do sistema imune, criando um ambiente supressor. Desta forma, foi avaliada a capacidade de indução de proliferação de linfócitos T por macrófagos oriundos de esferoides tratados com oxamato. Para isso, os macrófagos foram isolados dos esferoides por seleção positiva para CD45 para estimular linfócitos T alogênicos. Durante esse processo, os macrófagos passam por diversas lavagens antes da co-cultura com os linfócitos T, assim o efeito direto que o oxamato poderia ter nos linfócitos T seria desprezível. Os linfócitos T foram isolados de um doador diferente do doador de monócitos para cada experimento, desta forma os macrófagos oferecem um estímulo alogênico, por apresentarem moléculas de MHC diferentes do doador.

Macrófagos oriundos de esferoides da linhagem celular SW756 tratados com oxamato promoveram maior proliferação de linfócitos T CD4 e T CD8, enquanto os oriundos de esferoides C33 induziram proliferação semelhante ao controle (Figuras 23A). O efeito na proliferação linfocitária foi dose dependente, ou seja, foi mais pronunciado com uma proporção maior de macrófagos para linfócitos, além de ser mais acentuado nos macrófagos derivados de esferoides da linhagem celular positiva para HPV, SW756. A fração CD45 negativa, correspondente às células tumorais, apresentou menor efeito na taxa de proliferação linfocitária que a fração positiva, indicando que os macrófagos presentes nos esferoides foram os responsáveis pela indução da proliferação dos linfócitos T.

Os linfócitos que proliferaram em contato com macrófagos de esferoides controle de SW756, apresentaram maior expressão de CD25 que poderia estar relacionado a um fenótipo T regulador. Esta expressão foi mais elevada ($MFI = 4.226 \pm 768,6$ em SW756 contra $1.349 \pm 315,8$ em C33) nos linfócitos controle com estímulo de macrófagos de SW756 do que de C33, e uma elevada expressão dessa molécula pode estar associada ao fenótipo regulador (BAECHER-ALLAN; WOLF;

HAFLER, 2005). Já os linfócitos que proliferaram com os macrófagos de esferoides controle de C33 são possivelmente mais ativados, devido a maior expressão de CD69 e de HLA-DR (Figure 23B).

Além de promover a maior proliferação de linfócitos T, os macrófagos oriundos de esferoides de SW756 tratados com oxamato, levaram a uma diminuição da secreção de citocinas IL-4, IL-2 e IL-10 e aumento da secreção de IL-6 nestes linfócitos. Estes dados demonstraram que os macrófagos dos esferoides tratados com oxamato reduziram características da polarização T reguladora, pela redução de IL-10 e de CD25. Os macrófagos oriundos de esferoides de C33 tratados com oxamato, apesar de não induzirem maior proliferação de linfócitos T também contribuíram para a redução das citocinas IL-2 e IL-4 (Figura 24). A tempo, os linfócitos T co-cultivados com macrófagos, tanto oriundos de esferoides com células C33, como SW756, secretaram concentrações relativamente altas de IFN γ e TNF- α (IFN γ : SW756= 535,9 $\pm$ 190,7; C33= 360,4 $\pm$ 181,9; TNF- α : SW756= 492,2 $\pm$ 189,1; C33= 328,6 $\pm$ 157,6). Interessantemente, a concentração de IFN γ e TNF α , foi significativamente mais elevada em culturas de linfócitos T com macrófagos de esferoides com células SW. Esse resultado indica que esses linfócitos T tem viés para resposta Th1.

Figura 23 – Efeito de macrófagos isolados de esferoides de linhagens celulares de câncer cervical na proliferação de linfócitos T.

Macrófagos foram isolados de esferoides de co-cultura após o período de seis dias de diferenciação. Os esferoides foram dissociados e os macrófagos foram isolados por beads magnéticas anti-CD45. Macrófagos foram plaqueados nas razões indicadas para estimulação de linfócitos T, marcados com CellTrace e estimulados com uma concentração de 1:800 de fitohemaglutinina durante o período do experimento, isolados de doadores alógenos. (A) Proliferação de linfócitos T CD4 e T CD8 em contato com macrófagos de esferoides controle e tratados com oxamate, nas razões indicadas. “tumor” = células tumorais na razão 1:2. “LT” linfócitos T sem co-cultura. Gráficos demonstram média e desvio padrão da média de cinco experimentos independentes (B) Histogramas representativos da expressão de moléculas de superfície em linfócitos T CD4 e T CD8 que proliferaram (CellTrace^{low}) em contato com macrófagos de esferoides controle e tratados com oxamate, na razão 1:2. Asteriscos demonstram diferença estatística entre cinco experimentos independentes. * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$.

Figura 24 - Efeito de macrófagos isolados de esferoides de linhagens celulares de câncer cervical na expressão de citocinas por linfócitos T.

Macrófagos foram isolados de esferoides de co-cultura após o período de seis dias de diferenciação. Os esferoides foram dissociados e os macrófagos foram isolados por beads magnéticas anti-CD45. Macrófagos foram plaqueados nas razões indicadas para estimulação de linfócitos T, marcados com CellTrace e estimulados com uma concentração de 1:800 de fitohemaglutinina durante o período do experimento, isolados de doadores alogênicos. O sobrenadante das co-culturas foi coletado para avaliação da produção de citocinas por CBA (BD™ Cytometric Bead Array (CBA) - Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit - BD Biosciences). “MO” significa co-cultura macrófago e linfócitos na razão 1:2, “Tumor” significa co-cultura de células tumorais e linfócitos na razão 1:2 e LT significa linfócitos T sem co-cultura. Gráficos demonstram média e desvio padrão da média de cinco experimentos independentes *p<0,05 **p<0,001.

4.3.7 Efeito do bloqueio do canal transportador de monocarboxilato no fenótipo de macrófagos

Como demonstrado nos experimentos anteriores, o bloqueio da enzima lactato desidrogenase (LDH) nas células tumorais modificou o fenótipo dos macrófagos presentes nos esferoides de linhagens de câncer cervical. Para confirmar esses resultados e determinar se o efeito do lactato é dependente da captação deste pelos monócitos, o canal responsável pela captação de lactato, MCT-1, foi bloqueado nos monócitos, através da utilização do inibidor CHC, antes da adição destes aos esferoides com concentrações inalteradas de lactato.

O bloqueio da captação de lactato nos monócitos promoveu efeitos similares ao do bloqueio de LDH nas células tumorais, tanto no padrão de expressão dos marcadores avaliados quanto no perfil de citocinas (Figura 25). Esse resultado indicou que o lactato secretado pelas células tumorais necessita ser captado pelos monócitos a fim de exercer sua modulação no fenótipo dos macrófagos associados ao tumor.

Figura 25 – Infiltrado inflamatório em esferoides de linhagens celulares derivadas de câncer do colo uterino tratados com inibidor de MCT-1.

Para a geração de esferoides tumorais, 5×10^3 células SW756 e 15×10^3 células C33 foram cultivadas sobre colchão de 1% de agarose em placa de 96 cavidades. Após quatro dias de incubação, monócitos pré-incubados com 2 mM de CHC (inibidor de MCT1) foram adicionados aos esferoides. As co-culturas foram coletadas após seis dias, dissociadas e marcadas com anticorpos contra os marcadores indicados e analisados por citometria de fluxo. (A) Gráficos de frequência e expressão, representada por MFI das moléculas indicadas contidas na população CD45 positiva. Gráficos mostram média e erro padrão da média de cinco experimentos independentes. (B) Concentração de citocinas no sobrenadante das co-culturas. Os sobrenadantes das co-culturas foram coletados após o período de diferenciação dos macrófagos e analisados por CBA (BD™ Cytometric Bead Array (CBA) - Human Inflammatory Cytokine Kit - BD Biosciences). Valores representados pela concentração de citocinas em pg/mL em esferoides de co-cultura dividido pelo número de células vivas divididas por 10^6 . Gráficos mostram média e erro padrão da média de cinco experimentos. Sinais negativos (-) indicam controle enquanto positivos (+) indicam o tratamento com CHC. * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$.

4.4 Efeito do lactato em macrófagos-derivados de monócitos

Para melhor avaliar e confirmar o efeito do lactato na modulação do fenótipo de macrófagos, macrófagos-derivados de monócitos na ausência de células tumorais foram diretamente tratados com lactato. Para esses experimentos foram utilizadas duas doses de lactato, uma dose de 5 mM de lactato, por ser uma concentração próxima aos valores de lactato detectados nos esferoides (dentro da mesma ordem de grandeza), e o dobro desta, 10 mM, por possivelmente acentuar o efeito do lactato na modulação do fenótipo dos macrófagos.

Além de avaliar o efeito do lactato em macrófagos-derivados de monócitos diferenciados apenas com soro humano, também foram avaliados macrófagos diferenciados em meio contendo IL-6 e nos fenótipos M1 e M2. Para a diferenciação de macrófagos nos fenótipos M1 e M2, os monócitos foram tratados com as citocinas IFN- γ (M1) e IL-4 (M2). Esta é uma das metodologias para diferenciação de macrófagos nestes fenótipos, alternativamente é possível utilizar outras citocinas ou fatores de crescimento, como M-CSF (M2) e GM-CSF (M1) (AMBARUS et al., 2012). A citocina IL-6 está presente no microambiente tumoral, inclusive sendo associada, juntamente a outros fatores, à promoção de um fenótipo M2 em macrófagos tumorais (HEUSINKVELD et al., 2011). De acordo com os nossos resultados, as linhagens celulares positivas para HPV secretam mais IL-6 do que a linhagem celular negativa (Figura 5 e STONE et al., 2014). Sendo assim, essa citocina poderia estar relacionada as diferenças observadas nos fenótipos dos macrófagos associados ao HPV, ou até mesmo, agir em associação ao lactato nessa modulação.

Os macrófagos diferenciados em esferoides de linhagens de câncer cervical positivas e negativa para HPV apresentaram diferentes fenótipos. Os macrófagos associados às linhagens positivas apresentaram fenótipo misto com característica pró-tumoral, enquanto os da linhagem negativa, característica anti-tumoral. O bloqueio da produção de lactato alterou diferentes aspectos nesses dois fenótipos, portanto, nossa hipótese seria que o lactato possuiria diferente ação em macrófagos do tipo M1 e M2.

A presença da citocina IL-6 não alterou significativamente o fenótipo dos macrófagos quando comparados aos macrófagos “M0” (Figura 26). O tratamento destes com lactato, levou a diminuição significativa e dose-dependente da expressão de CD86 e de CD206, assim como diminuição significativa da expressão de CD86 e HLA-DR em macrófagos M2. Já o tratamento de macrófagos M1 com o lactato, acarretou em um

aumento de macrófagos triplo-positivos para CD14CD86, CD14CD64 e CD14HLA-DR (Figura 26 A-B). A expressão de citocinas por esses macrófagos não sofreu alteração significativa com o tratamento com lactato (Figura 27), no entanto, seriam necessárias mais repetições desse experimento. Interessantemente, o lactato promoveu uma maior sobrevivência dos macrófagos (Figura 28). O tratamento de macrófagos derivados de monócitos com lactato promoveu alterações na expressão de diversos marcadores de superfície, como observado na inibição da enzima LDH nas células tumorais ou o bloqueio do MCT-1 nos monócitos. No entanto, este efeito foi o oposto ao observado nos macrófagos associados aos esferoides, onde a diminuição do lactato promoveu a redução da intensidade (MFI) de marcadores em macrófagos associados aos esferoides das linhagens HPV positivas e o aumento da expressão (frequência) de marcadores em macrófagos associados a linhagem HPV negativa.

Figura 26 – Expressão de marcadores de superfície em macrófagos-derivados de monócitos tratados com lactato.

Monócitos de doadores saudáveis foram cultivados em placas de 24 cavidades com 5% de soro humano durante seis dias para a diferenciação de macrófagos. O tratamento com 5 mM de lactato sódico e/ou citocinas foi realizado no início da cultura, sendo repostado após três dias de cultura. M0: macrófagos diferenciados sem adição de citocinas; IL-6: macrófagos diferenciados com 20 ng/mL de IL-6, M1: macrófagos diferenciados com 10 ng/mL IFN- γ e M2: macrófagos diferenciados com 20 ng/mL de IL-4. Ao final da incubação, os macrófagos foram coletados, marcados com anticorpos contra os marcadores indicados e analisados por citometria de fluxo. (A) Frequência das populações indicadas contidas nas células CD45+. (B) Expressão de cada molécula avaliada indicada pela intensidade de fluorescência mediana (MFI) na população CD45+CD14+. Gráficos mostram média e erro padrão da média de cinco experimentos independentes * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$.

Figura 27 - Expressão de citocinas por macrófagos-derivados de monócitos tratados com lactato.

Monócitos de doadores saudáveis foram cultivados em placas de 24 cavidades com 5% de soro humano durante seis dias para a diferenciação de macrófagos. O tratamento com 5 mM de lactato sódico e/ou citocinas foi realizado no início da cultura, sendo repostado após três dias de cultura. M0: macrófagos diferenciados sem adição de citocinas; IL-6: macrófagos diferenciados com 20 ng/mL de IL-6, M1: macrófagos diferenciados com 10 ng/mL IFN- γ e M2: macrófagos diferenciados com 20 ng/mL de IL-4. Ao final da incubação, o sobrenadante dos macrófagos foi coletado para análise de expressão de citocinas por CBA (BD™ Cytometric Bead Array (CBA) - Human Inflammatory Cytokine Kit - BD Biosciences. Gráficos mostram média e erro padrão da média de cinco experimentos independentes. ** $p < 0,001$.

Figura 28 – Morte celular em macrófagos-derivados de monócitos tratados com lactato.

Monócitos de doadores saudáveis foram cultivados em placas de 24 cavidades com 5% de soro humano durante seis dias para a diferenciação de macrófagos. O tratamento com 5 mM de lactato sódico e/ou citocinas foi realizado no início da cultura, sendo repostado após três dias de cultura. M0: macrófagos diferenciados sem adição de citocinas; IL-6: macrófagos diferenciados com 20 ng/mL de IL-6, M1: macrófagos diferenciados com 10 ng/mL IFN- γ e M2: macrófagos diferenciados com 20 ng/mL de IL-4. Ao final da incubação, os macrófagos foram coletados e incubados com 0,1 μ M de DAPI para avaliação da morte celular por citometria de fluxo. Gráficos mostram média e erro padrão da média de cinco experimentos independentes * $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Macrófagos são, muitas vezes, as células mais abundantes do infiltrado inflamatório de tumores. Na maioria dos tumores, desempenham papel pró-tumoral e seu número é diretamente correlacionado a um pior prognóstico para o paciente (BISWAS; ALLAVENA; MANTOVANI, 2013). O papel do metabolismo tumoral na modulação destas células é pouco explorado e seu melhor entendimento poderia gerar conhecimento para o design de novas estratégias terapêuticas. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi estudar o papel do lactato secretado por células tumorais de câncer cervical na modulação do fenótipo de macrófagos humanos.

Conforme já observado pelo nosso grupo, em modelo animal, os tumores de câncer do colo uterino positivos para HPV, possuem maior eficiência no recrutamento de células mielóides para o microambiente tumoral (STONE et al., 2014). Além disso, resultados ainda não publicados do nosso laboratório, indicam que há aumento significativo na frequência de macrófagos M2 em biopsias de câncer do colo uterino, comparadas com biopsias de lesões precursoras de câncer (ALVAREZ, dados não publicados). Mais ainda, vários laboratórios têm demonstrado esse mesmo tipo de perfil em lesões do colo uterino (HAMMES et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2008). Deste modo, o modelo *in vitro* de cultura de esferoides reproduziu o observado *in vivo*, sendo justificável sua utilização para ampliar nossos conhecimentos sobre os efeitos do microambiente tumoral na diferenciação de macrófagos. Com a avaliação da frequência de macrófagos nos esferoides tumorais, foi observado que além da linhagem negativa para HPV, apresentar ao final do período de incubação, uma menor porcentagem de macrófagos, esta pareceu impedir a entrada destas células no interior dos esferoides.

Em experimentos anteriores, foi observado que as linhagens positivas para HPV (HeLa e SiHa) secretavam mais IL-6 e IL-8 que a negativa (C33), o que também foi demonstrado nos esferoides (principalmente para IL-6) (STONE et al., 2014). Interessantemente, anteriormente só foi possível observar a produção dessas citocinas quando as células tumorais eram isoladas dos tumores crescidos em animais e não em células em cultura em monocamada. Isso poderia ser devido ao microambiente tumoral, no entanto, agora foi possível observar a produção dessas citocinas já nos esferoides sem macrófagos, indicando que a própria estrutura tridimensional (por apresentar diversas características como hipóxia, diferença de pH e maior produção de lactato –

WALENTA et al, 2000) já foi responsável por essa produção. Contudo, quando os macrófagos estavam presentes, essa produção aumentou, sendo decorrente também dos próprios macrófagos ou de uma influência que estes exerceram nas células tumorais. De fato, a produção de IL-6 está associada a maior expressão da quimiocina CCL2, pela ativação de STAT3 (CHEN et al., 2015). Nossos resultados apontam uma maior produção de IL-6 pelas células positivas para HPV, além de uma maior ativação da via de STAT-3, isto poderia estar relacionado a maior produção de CCL2 que agiria como quimioatrativo para os monócitos. Em câncer cervical, CCL2 é um dos responsáveis pela atração de monócitos para o ambiente tumoral (PAHLER et al., 2008).

A interação de macrófagos nos esferoides de C33 não pareceu beneficiar esta linhagem, uma vez que, na presença destes leucócitos, as células tumorais apresentaram viabilidade reduzida. Este resultado está relacionado ao que observamos em tumores do colo uterino crescidos em animais, os quais apresentaram uma menor viabilidade celular nos tumores originados pela linhagem negativa para HPV, quando comparado àqueles positivos para HPV (STONE et al., 2014). Já os macrófagos diferenciados em esferoides de células positivas para HPV apresentaram marcadores de fenótipo misto, porém promoveram maior proliferação e viabilidade das células tumorais, além de secretar citocinas pró-tumorais. Desta forma, diferentemente dos macrófagos dos esferoides da linhagem celular negativa para HPV, estes macrófagos parecem estar envolvidos na manutenção e crescimento tumoral.

As células tumorais apresentam metabolismo alterado, consumindo a glicose principalmente pela via glicolítica (efeito Warburg). Esse desvio para a via glicolítica gera uma elevada produção de lactato no microambiente tumoral, que pode ser detectado sistemicamente em pacientes com massas tumorais grandes (FISCHER et al., 2007). O efeito do lactato na modulação do infiltrado inflamatório ainda é pouco explorado, porém já é estabelecida uma relação deste com o fenótipo pró-tumoral das células imunes (COLEGIO et al., 2014; FISCHER et al., 2007; GOTTFRIED et al., 2006).

Analisando a correlação entre produção de lactato e consumo de glicose, e também do bloqueio da via glicolítica, foi observado que as linhagens celulares positivas para HPV e a linhagem celular negativa para HPV apresentam diferenças no metabolismo energético. Em câncer de cabeça e pescoço, a presença de HPV alterou o metabolismo das células tumorais, as quais, além de apresentarem a via glicolítica ativa, também possuem a via fosforilativa ativa, com a utilização do lactato como fonte adicional de

energia (KRUPAR et al., 2014). Isto está correlacionado com os nossos resultados, uma vez que, nas linhagens positivas para HPV quando houve um aumento na liberação de lactato, o consumo de glicose foi menor ou inalterado, indicando que essas não dependem exclusivamente da glicose e consequentemente da via glicolítica, podendo utilizar parte do lactato como fonte energética ou ainda outras fontes energéticas, como a glutamina presente no meio de cultura (LE et al., 2012). Em estudos com a linhagem celular HeLa, foi observado que a glutamina é a maior fonte de energia para essa célula (REITZER, WICE, 1979). O contrário ocorreu na linhagem negativa para HPV, onde uma maior liberação de lactato depende de um maior consumo de glicose, logo, esta linhagem seria mais dependente da via glicolítica.

A redução da produção de lactato nos esferoides tratados com o inibidor oxamato, não foi significativa para todas as linhagens celulares. Ainda assim, o tratamento das células tumorais com oxamato foi capaz de modular o fenótipo dos macrófagos associados aos esferoides dessas. Nesses experimentos, o oxamato foi adicionado apenas no terceiro dia de cultura dos esferoides que neste momento já secretavam elevada concentração de lactato. Para a dosagem do lactato, os esferoides foram lavados antes da adição do oxamato a fim de remover parte do lactato já produzido. No entanto, essa etapa pode não ter sido eficaz na completa remoção deste metabolito, uma vez que, este está presente inclusive no interior dos esferoides (WALENTA et al., 2000b). Fischer e colaboradores (FISCHER et al., 2007) demonstraram uma redução mais acentuada na produção de lactato quando os esferoides foram tratados com o inibidor oxamato a partir do dia zero, que se manteve reduzida por até dez dias de experimento. Optamos por um tratamento apenas no terceiro dia para permitir a organização e crescimento inicial dos esferoides sem nenhuma interferência.

Outra hipótese do efeito do tratamento com oxamato, seria um efeito direto desse inibidor nas células tumorais, além da inibição da produção de lactato. Com o bloqueio de LDH pelo oxamato, ocorre um acúmulo de piruvato intracelular o qual é forçado a entrar no ciclo do ácido cítrico. Como a maioria das células tumorais apresenta redução da via de fosforilação oxidativa, com o bloqueio de LDH, ocorre uma ativação anormal dessa via, culminando em uma grande produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (ZHAI et al., 2013). Apesar desses possíveis efeitos diretos do oxamato nas células tumorais, quando os monócitos foram tratados com o inibidor de MCT-1, foram observados efeitos similares aos obtidos com o bloqueio da produção de lactato pelas células tumorais. Além de fortalecer os resultados com oxamato, a inibição dos canais

MCT-1 indica que o lactato precisa ser captado pelos monócitos para a modulação do fenótipo dos macrófagos.

Ainda não está totalmente elucidado o papel de receptores celulares para o lactato. Recentemente foi descrito que um receptor de membrana celular acoplado a proteína G, GPR81, para o lactato estaria envolvido na modulação de macrófagos (HOQUE et al., 2014). No entanto, nossos resultados e o de outros, indicam que o lactato necessita ser captado para ter efeito. Lee e colaboradores (LEE et al., 2015) demonstraram que o lactato está envolvido na regulação da hipóxia em células tumorais pela associação à proteína intracelular NDRG3, uma proteína da família *N-myc downstream regulated gene*, em um mecanismo independente de HIF-1 α . O lactato protege NDRG3 da degradação via PDH2/VHL (mesmo mecanismo de degradação de HIF-1 α), que irá ampliar o efeito da hipóxia, através da ativação da via Raf-ERK, garantindo maior proliferação celular e angiogênese. A hipóxia possui importante papel na modulação do fenótipo dos macrófagos e o lactato também poderia estar envolvido na modulação dessa resposta.

Outro possível mecanismo de ação do lactato na modulação do fenótipo de macrófagos poderia estar associado a acidificação intracelular. O inibidor CHC atua no bloqueio de MCT-1, canal responsável pela captação de lactato. No entanto, este apresenta maior eficácia na inibição do transporte de piruvato para a mitocôndria do que na inibição do transporte de lactato para do meio externo para o citoplasma da célula. Sendo assim, o CHC pode aumentar a produção de ácido láctico pela via glicolítica e diminuir o pH intracelular (HALESTRAP; PRICE, 1999b). Do mesmo modo, o lactato secretado pelas células tumorais, quando captado pelos macrófagos, também pode exercer uma redução do pH intracelular (DOUVDEVANI et al., 1995).

Quando a produção de lactato pelas linhagens celulares derivadas de câncer do colo uterino foi dividida pelo número de células do esferoide, a linhagem CasKi foi a maior produtora desse metabólito. Interessantemente, CasKi também foi a linhagem que apresentou um maior infiltrado de macrófagos. No entanto, quando a produção de lactato foi bloqueada não foi observado efeito no recrutamento de macrófagos para os esferoides, indicando que apenas o lactato não foi o responsável pelo recrutamento dos macrófagos para os esferoides. Entretanto, outros estudos demonstraram que o lactato possui efeito na atração de macrófagos para o ambiente tumoral (ZHAO et al., 2015a).

Independentemente do efeito no recrutamento de macrófagos, o bloqueio da produção de lactato por oxamato, desencadeou diversas alterações fenotípicas nos

macrófagos tumorais, dependendo do tipo celular a que estavam associados. Em esferoides de linhagens HPV positivas, o bloqueio da enzima LDH nas células tumorais ou dos canais MCT-1 nos monócitos ocasionou uma redução de marcadores de superfície e citocinas nos macrófagos, além de uma ativação da via de NF- κ B. Deste modo, o lactato está envolvido na modulação do fenótipo misto e pró-tumoral desses macrófagos, uma vez que, quando esses macrófagos foram isolados de esferoides tratados com oxamato, e utilizados como estímulo para linfócitos T, estes contribuíram para uma maior proliferação de linfócitos T. Já em esferoides da linhagem HPV negativa, o tratamento com oxamato, está associado a um aumento na frequência de macrófagos CD14CD206 e CD14HLA-DR, além de um aumento de TNF- α . Interessantemente, esses macrófagos parecem adquirir características anti-tumorais, evidenciado pela redução no número celular nos esferoides tratados com oxamato. No entanto, estes não induziram maior proliferação de linfócitos T. Ou seja, parece que há modulação de respostas inatas, e não necessariamente respostas adaptativas. De fato, o aumento da produção de TNF- α observado nos macrófagos associados aos esferoides de C33 tratados com oxamato, pode estar envolvido na maior indução da morte de células tumorais (KELLER et al, 1990). Já as células tumorais HPV positivas possivelmente não são afetadas por TNF- α , uma vez que, as oncoproteínas de HPV conferem resistência a ação dessa citocina (YUAN et al, 2005). Os macrófagos oriundos de esferoides de SW756 induziram a proliferação de linfócitos T e estes secretam tanto citocinas relacionadas ao fenótipo Th1 quanto apresentam características do fenótipo T regulador (expressão de CD25 alta e produção de IL-10). Sabidamente, há várias populações circulantes de linfócitos T, incluindo 2-3% de linfócitos T reguladores (BAECHER-ALLAN; WOLF; HAFLER, 2005). Em nossos experimentos, nós utilizamos populações mistas de linfócitos T circulantes, portanto incluindo diferentes subtipos destas células. Com isso, é possível e provável, que estejamos vendo ativação de diferentes tipos de resposta em um mesmo experimento, buscando definir se os macrófagos utilizados foram capazes de modular respostas já existentes. De fato, quando esses macrófagos foram oriundos de esferoides SW756 tratados com oxamato, eles promoveram redução de IL-10, IL-2 e IL-4, e de CD25, possivelmente favorecendo a proliferação de células com perfil Th1.

Nos experimentos de macrófagos cultivados diretamente com lactato foi possível observar que este metabolito promoveu a redução de diversos marcadores de superfície em macrófagos M0, tratados com IL-6 ou diferenciados em M2 e um aumento em

marcadores de superfície em macrófagos diferenciados em M1. Nos esferoides, a presença do lactato induziu a expressão desses marcadores, contrário observado nos macrófagos derivados de monócitos. Esse resultado indica que o lactato foi capaz de modular essas moléculas, porém há outros fatores no microambiente tumoral que levam às células lá presentes a integrar sinais, gerando respostas nem sempre similares às respostas de monoculturas.

Pouco é conhecido sobre o mecanismo pelo qual o lactato modula o fenótipo de macrófagos. Samuvel e colaboradores (SAMUVEL et al., 2009), demonstraram que o lactato, através da ativação de NF- κ B, promove um fenótipo de macrófago inflamatório, enquanto Colegio e colaboradores (COLEGIO et al., 2014), demonstraram que o lactato, através da estabilização de HIF-1 α , induz um fenótipo M2 em macrófagos, promovendo resposta pró-tumoral. No entanto, a regulação dessas vias é um processo complexo, visto que essas são interligadas e apresentam diversos mecanismos de regulação. Na figura 29, estão ilustradas possíveis vias envolvidas na modulação do fenótipo dos macrófagos ativados por lactato. Conforme já descrito, o lactato, através da ativação do TLR4, induz a ativação de NF- κ B (SAMUVEL et al., 2009), responsável pela regulação dos marcadores HLA-DR e CD86 além das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-8. De fato, o bloqueio de LDH promoveu alterações na expressão dessas proteínas e de citocinas, com a redução de todos, exceto IL-8, nos macrófagos associados as linhagens positivas para HPV, e um aumento da expressão de HLA-DR nos macrófagos da linhagem HPV negativa. No entanto, o bloqueio de LDH acarretou na ativação de NF- κ B que poderia, portanto, estar envolvido na regulação de IL-8.

O fator de transcrição HIF-1 α também pode ser ativado por lactato (COLEGIO et al., 2014). No entanto, não foi demonstrado se essa ativação ocorre diretamente por lactato ou seria por algum efeito indireto da ativação de TLR4 ou ainda outra via. Por outro lado, um dos grandes responsáveis pelo fenótipo alternativo dos macrófagos, é o oncogene c-Myc. Além de ativar a via de STAT6, responsável pela indução do fenótipo M2, também aumenta a expressão de HIF-1 α (PELLO et al., 2012). Desta forma, por regular diferentes aspectos do fenótipo M2 e pró-tumoral, c-Myc poderia ser um alvo direto do lactato, ou ainda, o lactato poderia regular a via de STAT6, assim explicando a regulação do marcador CD206. Outra via envolvida no fenótipo dos macrófagos é a via de STAT-3, sendo ativada por IL-10 e IL-6 e promovendo a liberação dessas citocinas pelos macrófagos (STAPLES et al., 2007). Além disso, essa via também está envolvida na ativação de HIF-1 α (XU et al., 2005). A ação do lactato nessa via poderia explicar a

redução de IL-10 e de IL-6 quando os esferoides são tratados com oxamato e o aumento de IL-10 nos macrófagos tratados diretamente com lactato. No entanto, em nosso modelo não foi observada alteração significativa da ativação de STAT3 entre os macrófagos de esferoides controle e tratados.

Figura 29 - Possíveis vias reguladas por lactato em macrófagos.

Esquema ilustrativo de vias envolvidas na regulação do fenótipo de macrófagos. Linhas pretas grossas demonstram a atividade de lactato comprovada na literatura, enquanto linhas pretas grossas pontilhadas demonstram pontos sugeridos para a ação de lactato. Linha preta fina pontilhada demonstra uma possível interação entre NF-κB e HIF-1α.

O mecanismo de ação do lactato é complexo e possivelmente dependente da modulação de mais de uma via de sinalização. O bloqueio da produção de lactato afetou globalmente o fenótipo dos macrófagos. Em monócitos humanos tratados com lactato foi demonstrada redução da ativação de NF-κB e de Akt e retardo na expressão de fatores pró-inflamatórios (PETER et al, 2015). Esse efeito poderia persistir na diferenciação dos macrófagos.

Nossos resultados indicam que os macrófagos associados aos esferoides de C33 são mais pró-inflamatórios enquanto os das linhagens HPV positivas apresentam características anti-inflamatórias. Como o lactato modula diferentemente os macrófagos associados aos esferoides das linhagens HPV positivas e negativa, acreditamos que este possivelmente age em sinergismo com outros fatores do microambiente tumoral. O bloqueio da produção de lactato no microambiente tumoral poderia apresentar um importante potencial terapêutico, evidenciado pela modulação do fenótipo e função dos macrófagos.

6 CONCLUSÕES

- O modelo de cultura *in vitro* de esferoides tumorais foi capaz de mimetizar aspectos de tumores crescidos *in vivo*, contribuindo para o estudo da interação entre células tumorais e macrófagos. Desta forma este modelo pode ser utilizado, em muitos parâmetros como método alternativo à experimentação animal;
- Esferoides de linhagens tumorais de câncer cervical positivas e negativa para HPV modularam diferentemente o fenótipo de macrófagos. Macrófagos associados as linhagens positivas, apresentaram fenótipo misto com características pró-tumorais, como a indução de maior sobrevivência/proliferação das células tumorais, enquanto os associados a linhagem negativa para HPV, apresentaram características anti-tumorais pela evidenciado pela indução de morte celular nas células tumorais;
- As linhagens positivas e negativa para HPV apresentaram diferenças no metabolismo energético. As linhagens positivas possivelmente além da glicose, utilizam outros recursos energéticos, enquanto a linhagem negativa para HPV foi mais dependente da via glicolítica;
- O bloqueio da enzima lactato desidrogenase desencadeou diferentes efeitos no fenótipo dos macrófagos, dependendo do tipo celular a que estavam associados. Em macrófagos associados às linhagens positivas para HPV, o tratamento com oxamato promoveu uma redução na expressão dos marcadores CD206, CD86, HLA-DR e CD64, e das citocinas IL-10, IL-6, IL-1 β e TNF- α , além de uma ativação da via de NF-kB e maior indução de proliferação de linfócitos T e modulação do fenótipo dos mesmos para um fenótipo mais direcionado a Th1. Por outro lado, em macrófagos associados à linhagem HPV negativa, o tratamento com oxamato promoveu uma maior expressão dos marcadores CD206 e HLA-DR e de TNF- α , além de contribuir em maior morte celular no esferoide;
- Apesar do tratamento com oxamato promover diferentes efeitos nos macrófagos associados as linhagens positivas ou negativa para HPV, este tratamento possui potencial efeito anti-tumoral, pelo aumento da proliferação de linfócitos T e morte de células tumorais;

- O tratamento com lactato foi capaz de modular o fenótipo de macrófagos derivados de monócitos, modulando os mesmos marcadores alterados em macrófagos associados aos esferoides. Além disso promoveu uma maior sobrevivência dessas células;
- O lactato possui importante papel na modulação pró-tumoral de macrófagos tumorais e o bloqueio da sua produção ou captação pode oferecer uma nova estratégia para o combate do câncer cervical.

Figura 30- Efeitos na modulação do fenótipo de macrófagos pelo lactato secretado por linhagens tumorais derivadas de câncer cervical.

Macrófagos associados aos esferoides de linhagens celulares de câncer cervical HPV positivas promoveram uma maior proliferação e viabilidade tumoral. O bloqueio da produção de lactato, diminuiu a expressão de diferentes marcadores de superfície e citocinas nesses macrófagos, aumentou a produção de IL-8 e a ativação das vias de NF-κB e de Akt. Ademais, estes macrófagos foram capazes de favorecer a proliferação de linfócitos com perfil Th1. Macrófagos associados a linhagem celular de câncer cervical HPV negativa diminuíram a viabilidade tumoral. O bloqueio da produção de lactato nas células tumorais, promoveu um aumento na expressão de moléculas de superfície e citocinas nos macrófagos, além de maior morte de células tumorais e favorecimento do perfil de linfócitos Th1.

REFERÊNCIAS *

- ALTOMARE, D. A; TESTA, J. R. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. **Oncogene**, v. 24, n. 50, p. 7455–7464, 2005.
- AMBARUS, C. A et al. Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. **Journal of immunological methods**, v. 375, n. 1-2, p. 196–206, 2012.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2015**. Atlanta: American Cancer Society, 2015. 68p.
- ANTONSSON, A. et al. The human papillomavirus type 16 E7 protein binds human interferon regulatory factor-9 via a novel PEST domain required for transformation. **Journal of interferon & cytokine research**, v. 26, n. 7, p. 455–461, 2006.
- ASHRAFI, G. H. et al. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. **International journal of cancer**, v. 113, n. 2, p. 276–283, 2005.
- BAECHER-ALLAN, C.; WOLF, E.; HAFLE, D. A. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells. **Clinical immunology**, v. 115, n. 1, p. 10–18, 2005.
- BAI, D.; UENO, L.; VOGT, P. K. Akt-mediated regulation of NFκB and the essentialness of NFκB for the oncogenicity of PI3K and Akt. **International journal of cancer**, v. 125, n. 12, p. 2863–2870, 2009.
- BEN-NERIAH, Y.; KARIN, M. Inflammation meets cancer, with NF-κB as the matchmaker. **Nature Immunology**, v. 12, n. 8, p. 715–723, 2011.
- BERNARD, H.-U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70–79, 2010.
- BERRA, E. et al. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1α in normoxia. **EMBO Journal**, v. 22, n. 16, p. 4082–4090, 2003.
- BINGLE, L.; BROWN, N. J.; LEWIS, C. E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: Implications for new anticancer therapies. **Journal of Pathology**, v. 196, n. 3, p. 254–265, 2002.
- BISWAS, S. K.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. **Seminars in immunopathology**, v. 35, n. 5, p. 585–600, 2013.
- BISWAS, S. K.; LEWIS, C. E. NF-κB as a central regulator of macrophage function in tumors. **Journal of leukocyte biology**, v. 88, n. 11, p. 1–8, 2010.
- BOLPETTI, A. et al. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. **BMC immunology**, v. 11, p. 11-27, 2010.
- BURKE, B. et al. Hypoxia-Induced Gene Expression in Human Macrophages. **The American Journal of Pathology**, v. 163, n. 4, p. 1233–1243, 2003.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- CAIRNS, R. A; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature reviews. Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85–95, 2011.
- CARTER, J. J. et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 181, n. 6, p. 1911–1919, 2000.
- CHEN, W. et al. The CCL2/CCR2 axis enhances IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition by cooperatively activating STAT3-Twist signaling. **Tumor Biology**, v. 36, n. 2, p. 973–981, 2015.
- CHRISTOFK, H. R. et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. **Nature**, v. 452, n. 7184, p. 230–233, 2008.
- COLEGIO, O. R. et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 559–563, 2014.
- COLEMAN, N. et al. Immunological events in regressing genital warts. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 102, n. 6, p. 768–774, 1994.
- COVARRUBIAS, A. J. et al. Akt-mTORC1 signaling regulates Acly to integrate metabolic input to control of macrophage activation. **eLife**, v. 5, p. 1–19, 2016.
- COVARRUBIAS, A. J.; AKSOYLAR, H. I.; HORNG, T. Control of macrophage metabolism and activation by mTOR and Akt signaling. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 4, p. 286–296, 2015.
- CURI, R.; NEWSHOLME, P.; NEWSHOLME, E. A. Metabolism of pyruvate by isolated rat mesenteric lymphocytes, lymphocyte mitochondria and isolated mouse macrophages. **Biochemical Journal**, v. 250, n. 2, p. 383–388, 1988.
- CURIEL, T. J. et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **Nature medicine**, v. 10, n. 9, p. 942–949, 2004.
- CROOK, T.; WREDE, D.; VOUSDEN, K. H. p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. **Oncogene**, v. 6, n. 5, p. 873–875, 1991.
- DE JONG, A. et al. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4⁺ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. **Cancer research**, v. 64, n. 15, p. 5449–5455, 2004.
- DE VILLIERS, E.-M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 2004.
- DEBERARDINIS, R. J. et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 49, p. 19345–19350, 2007.
- DEBERARDINIS, R. J. et al. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. **Cell metabolism**, v. 7, n. 1, p. 11–20, 2008.
- DIETL, K. et al. Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes. **Journal of immunology**, v. 184, n. 3, p. 1200–1209, 2010.
- DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of clinical virology**, v. 32 Suppl 1, p. S7–S15, 2005.

- DOORBAR, J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 80–98, 2013.
- DOUVDEVANI, A. et al. Intracellular acidification mediates the inhibitory effect of peritoneal dialysate on peritoneal macrophages. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 6, p. 207–213, 1995.
- DUENSING, S. et al. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 18, p. 10002–10007, 2000.
- DYSON, N. et al. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, v. 243, n. 4893, p. 934–937, 1989.
- EGAWA, N. et al. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3863–3890, 2015.
- EINSTEIN, M. H. et al. Comparison of the immunogenicity and safety of CervarixTM and Gardasil[®] human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18–45 years. **Human Vaccines**, v. 5, n. 10, p. 705–719, 2009.
- ELSTROM, R. L. et al. Akt Stimulates Aerobic Glycolysis in Cancer Cells Akt Stimulates Aerobic Glycolysis in Cancer Cells. **Cancer Research**, v.12 p. 3892–3899, 2004.
- FANTIN, V. R.; ST-PIERRE, J.; LEDER, P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. **Cancer Cell**, v. 9, n. 6, p. 425–434, 2006.
- FREEDMAN, R. S. et al. Characterization of a cell line (SW756) derived from a human squamous carcinoma of the uterine cervix. **In Vitro**, v. 18, n. 8, p. 719–726, 1982.
- FEHRMANN, F.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene**, v. 22, n. 33, p. 5201–5207, 2003.
- FERON, O. Pyruvate into lactate and back: From the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. **Radiotherapy and Oncology**, v. 92, n. 3, p. 329–333, 2009.
- FISCHER, K. et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. **Blood**, v. 109, n. 9, p. 3812–3819, 2007.
- GALVÁN-PEÑA, S.; O'NEILL, L. A. J. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 7, p. 1–6, 2014.
- GEIJERSSTAM, V. AF et al. Stability over Time of Serum Antibody Levels to Human Papillomavirus Type 16. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 6, p. 1710–1714, 1998.
- GINHOUX, F.; JUNG, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 6, p. 392–404, 2014.
- GIRAUDO, E.; INOUE, M.; HANAHAN, D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 5, p. 623–633, 2004.

GLOBOCAN. **Cancer Incidence and Mortality Worldwide**, 2012. Lyon, France:International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>> Acesso em: 10 jun 2016.

GOMEZ PERDIGUERO, E. et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. **Nature**, v. 518, n. 7540, p. 547–551, 2014.

GOODWIN, E. C.; DIMAIO, D. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 23, p. 12513–12518, 2000.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593–604, 2010.

GOTTFRIED, E. et al. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. **Blood**, v. 107, n. 5, p. 2013–2021, 2006.

GOTTFRIED, E.; KREUTZ, M.; MACKENSEN, A. Tumor metabolism as modulator of immune response and tumor progression. **Seminars in cancer biology**, v. 22, n. 4, p. 335–341, 2012.

GUZY, R. D. et al. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. **Cell Metabolism**, v. 1, n. 6, p. 401–408, 2005.

HALESTRAP, A. P. A. P.; PRICE, N. T. N. T. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. **The Biochemical journal**, v. 343 Pt 2, p. 281–299, 1999.

HAMMES, L. S. et al. Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression--clinicopathological correlation. **Gynecologic oncology**, v. 105, n. 1, p. 157–165, 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HASAN, U. A et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. **Journal of immunology**, v. 178, n. 5, p. 3186–3197, 2007.

HASHIMOTO, D. et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. **Immunity**, v. 38, n. 4, p. 792–804, 2013.

HENSLEY, C. T. et al. Metabolic Heterogeneity in Human Lung Tumors. **Cell**, v. 164, n. 4, p. 681–694, 2016.

HEUSINKVELD, M. et al. M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4⁺ Th1 cells. **Journal of immunology**, v. 187, n. 3, p. 1157–1165, 2011.

HEUSINKVELD, M.; VAN DER BURG, S. H. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. **Journal of translational medicine**, v. 9, p. 216, 2011.

HIRSCHHAEUSER, F.; SATTLER, U. G.; MUELLER-KLIESER, W. Lactate: a metabolic key player in cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 22 p. 6921-6925, 2011.

- HOQUE, R. et al. Lactate reduces liver and pancreatic injury in toll-like receptor- and inflammasome-mediated inflammation via gpr81-mediated suppression of innate immunity. **Gastroenterology**, v. 146, n. 7, p. 1763–1774, 2014.
- HUSAIN, Z. et al. Tumor-Derived Lactate Modifies Antitumor Immune Response: Effect on Myeloid-Derived Suppressor Cells and NK Cells. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 3, p. 1486–1495, 2013.
- IMTIYAZ, H. Z. et al. Hypoxia-inducible factor 2 α regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. **The journal of clinical investigation**, v. 120, n. 8, p. 2699–2714, 2010.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativas 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 126 p.
- ISHIKAWA, K. et al. ROS-Generating Mitochondrial DNA Mutations Can Regulate Tumor Cell Metastasis. **Science**, v. 320, n. 5876, p. 661–664, 2008.
- JEON, S.; B L ALLEN-HOFFMANN; LAMBERT, P. F. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. **Journal of virology**, v. 92, n. 2, p. 1654–1658, 1995.
- JHA, A. K. et al. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. **Immunity**, v. 42, n. 3, p. 419–430, 2015.
- KABSCH, K. et al. The HPV-16 E5 Protein Inhibits TRAIL- and FasL-Mediated Apoptosis in Human Keratinocyte Raft Cultures. **Intervirolgy**, v. 47, n. 1, p. 48–56, 2004.
- KELLER, R. et al. Mechanisms of macrophage-mediated tumor cell killing: A comparative analysis of the roles of reactive nitrogen intermediates and tumor necrosis factor. **International journal of cancer**, v. 46, n. 4, p. 682–686, 1990.
- KIM, J. et al. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. **Cell metabolism**, v. 3, n. 3, p. 177–185, 2006.
- KIM, J. et al. Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. **Molecular and cellular biology**, v. 27, n. 21, p. 7381–7393, 2007.
- KIRK, P. et al. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. **The EMBO journal**, v. 19, n. 15, p. 3896–3904, 2000.
- KIYONO, T. et al. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. **Nature**, v. 396, n. 11, p. 6–10, 1998.
- KOBAYASHI, A et al. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. **Mucosal immunology**, v. 1, n. 5, p. 412–420, 2008.
- KOPPENOL, W. H.; BOUNDS, P. L.; DANG, C. V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. **Nature Review: Cancer**, v. 11, n. 5, p. 325–337, 2011.

- KRUPAR, R. et al. Immunologic and metabolic characteristics of HPV-negative and HPV-positive head and neck squamous cell carcinomas are strikingly different. **Virchows Archive**, v. 465, n. 3, p. 299–312, 2014.
- LE, A. et al. Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. **Cell metabolism**, v. 15, n. 1, p. 110–121, 2012.
- LEE, D. C. et al. A lactate-induced response to hypoxia. **Cell**, v. 161, n. 3, p. 595–609, 2015.
- LEPIQUE, A. P. et al. HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses. **Clinical cancer research**, v. 15, n. 13, p. 4391–400, 2009.
- LEPIQUE, A. P.; RABACHINI, T.; VILLA, L. L. HPV vaccination: the beginning of the end of cervical cancer? - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 1–10, 2009.
- LEWIS, C.; MURDOCH, C. Macrophage Responses to Hypoxia. **American Journal of Pathology**, v. 167, n. 3, p. 627–635, 2005.
- LIU, C. et al. Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 5, p. 2811–2822, 2009.
- LORUSSO, G.; RÜEGG, C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. **Histochemistry and cell biology**, v. 130, n. 6, p. 1091–103, 2008.
- LU, H. et al. Cetuximab reverses the Warburg effect by inhibiting HIF-1-regulated LDH-A. **Molecular cancer therapeutics**, v. 12, p. 2187–2199, 2013.
- MARKUS MUNDER, KLAUS EICHMANN, M. M. Alternative Metabolic States in Murine Macrophages Reflected by the Nitric Oxide Synthase/Arginase Balance: Competitive Regulation by CD4? T Cells Correlates with Th1/Th2 Phenotype. **Journal of Immunology**, v. 160, p. 5347–5354, 1998.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estratégia de vacinação contra HPV**, 2015. Disponível em: <http://pni.datasus.gov.br/consulta_hpv_15_C27.php> Acesso em: 15 jul 2016.
- MOSCICKI, A.-B. et al. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. **Vaccine**, v. 24 Suppl 3, p. S3/42–51, 2006.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008.
- MÜNGER, K. et al. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. **Journal of virology**, v. 63, n. 10, p. 4417–4421, 1989.
- MURDOCH, C. et al. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 8, p. 618–631, 2008.
- NATHAN, C.; DING, A. Snapshot: Reactive oxygen intermediates (ROI). **Cell**, v. 140, n. 6, p. 8–10, 2010.
- ODEGAARD, J. I. et al. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1116–1120, 2007.

- OZBUN, M. A.; MEYERS, C. Temporal Usage of Multiple Promoters during the Life Cycle of Human Papillomavirus Type 31b. **Journal of Virology**, v. 72, n. 4, p. 2715–2722, 1998.
- PAHLER, J. C. et al. Plasticity in Tumor-Promoting Inflammation : Impairment of Macrophage Recruitment Evokes a Compensatory. **Neoplasia**, v. 10, n. 4, p. 329–339, 2008.
- PALEFSKY, J. M. et al. Cervicovaginal Human Papillomavirus Infection in Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV)-Positive and High-Risk HIV-Negative Women. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 3, p. 226–236, 1999.
- PALSSON-MCDERMOTT, E. M. et al. Pyruvate kinase M2 regulates hif-1 α activity and il-1 β induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages. **Cell Metabolism**, v. 21, n. 1, p. 65–80, 2015.
- PELLO, O. M. et al. Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology. **Blood**, v. 119, n. 2, p. 411–421, 2012.
- PETER, K. et al. Lactic acid delays the inflammatory response of human monocytes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 457, n. 3, p. 412–418, 2015.
- PETTERSEN, J. S. et al. Tumor-Associated Macrophages in the Cutaneous SCC Microenvironment Are Heterogeneously Activated. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 6, p.1322-1330, 2011.
- PIERSMA, S. J. et al. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. **Cancer research**, v. 67, n. 1, p. 354–361, 2007.
- PINHEIRO, C. et al. Increasing expression of monocarboxylate transporters 1 and 4 along progression to invasive cervical carcinoma. **International journal of gynecological pathology**, v. 27, n. 4, p. 568–574, 2008.
- POLLARD, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 1, p. 1–8, 2004.
- POLLARD, J. W. Trophic macrophages in development and disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 4, p. 259–270, 2009.
- REITZER, WICE, K. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 254, n. 8, p. 2669-2676, 1979.
- ROLAND, C. L. et al. Cell surface lactate receptor GPR81 is crucial for cancer cell survival. **Cancer Research**, v. 74, n. 18, p. 5301–5310, 2014.
- ROMANCZUK, H.; HOWLEY, P. M. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 7, p. 3159–3163, 1992.
- RONCO, L. V. et al. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. **Genes & Development**, v. 12, n. 13, p. 2061–2072, 1998.

- SAMUVEL, D. J. et al. Lactate boosts TLR4 signaling and NF-kappaB pathway-mediated gene transcription in macrophages via monocarboxylate transporters and MD-2 up-regulation. **Journal of immunology**, v. 182, n. 4, p. 2476–2484, 2009.
- SCHEFFNER, M. et al. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, v. 63, n. 6, p. 1129–1136, 1990.
- SELLERI, S. et al. Human mesenchymal stromal cell-secreted lactate induces M2-macrophage differentiation by metabolic reprogramming. **Oncotarget**, v. 7, n. 21, p. 30193–30210, 2016.
- SHIME, H. et al. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway. **Journal of immunology**, v. 180, n. 11, p. 7175–7183, 2008.
- SICA, A et al. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. **Journal of immunology**, v. 164, n. 2, p. 762–767, 2000.
- STANLEY, M. HPV vaccines: are they the answer? **British medical bulletin**, v. 88, n. 1, p. 59–74, 2008.
- STANLEY, M. A. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 2, p. 215–222, 2012.
- STAPLES, K. J. et al. IL-10 induces IL-10 in primary human monocyte-derived macrophages via the transcription factor Stat3. **Journal of immunology**, v. 178, n. 8, p. 4779–4785, 2007.
- STARR, R. et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. **Nature**, v. 387, n. 6636, p. 917–921, 1997.
- STEIN, M. et al. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **The Journal of experimental medicine**, v. 176, n. 7, p. 287–292, 1992.
- STONE, S. C. et al. HPV associated tumor cells control tumor microenvironment and leukocytosis in experimental models. **Immunity, inflammation and disease**, v. 2, n. 2, p. 63–75, 2014.
- STÖPPLER, M. C. et al. The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. **Virology**, v. 223, n. 1, p. 251–254, 1996.
- STOUT, R. D. et al. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. **Journal of immunology**, v. 175, n. 1, p. 342–349, 2005.
- STRAIGHT, S. W. et al. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. **Journal of virology**, v. 67, n. 8, p. 4521–4532, 1993.
- TALKS, K. L. et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. **The American journal of pathology**, v. 157, n. 2, p. 411–421, 2000.
- TANNAHILL, G. M. et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 238–242, 2013.
- TINDLE, R. W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 1, p. 59–65, 2002.

TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nature reviews. Drug discovery**, v. 8, n. 7, p. 579–591, 2009.

UM, S. J. et al. Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo. **Cancer letters**, v. 179, n. 2, p. 205–212, 2002.

VAN DER BURG, S. H. et al. Association of cervical cancer with the presence of CD4+ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 29, p. 12087–12092, 2007.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 2009.

VATS, D. et al. Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation. **Cell Metabolism**, v. 4, n. 1, p. 13–24, 2006.

VISSER, J. et al. Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. **Clinical and experimental immunology**, v. 150, n. 2, p. 199–209, 2007.

VOGEL, D. Y. et al. Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, n. 1, p. 10–35, 2013.

W, L. et al. Down-regulation of HLA class I antigen in human papillomavirus type 16 E7 expressing HaCaT cells: correlate with TAP-1 expression. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 20, n. 2, p. 227–232, 2010.

WALBOOMERS, J. M. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **Journal of Pathology**, v. 189, n. 1, p. 12–19, 1999.

WALENTA, S. et al. Correlation of High Lactate Levels in Head and Neck Tumors with Incidence of Metastasis. **American journal of pathology**, v. 150, n. 2, p. 409–415, 1997.

WALENTA, S. et al. High Lactate Levels Predict Likelihood of Metastases , Tumor Recurrence , and Restricted Patient Survival in Human Cervical Cancers. **Cancer Research**, v. 60, p. 916–921, 2000a.

WALENTA, S. et al. Metabolic Imaging in Multicellular Spheroids of Oncogene-transfected Fibroblasts. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 509–522, 2000b.

WARBURG, O. On the Origin of Cancer Cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 350–352, 1956.

WELTERS, M. J. P. et al. Detection of human papillomavirus type 18 E6 and E7-specific CD4+ T-helper 1 immunity in relation to health versus disease. **International journal of cancer**, v. 118, n. 4, p. 950–956, 2006.

WENZEL, C. et al. 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. **Experimental Cell Research**, v. 323, n. 1, p. 131–143, 2014.

- WHITESIDE, M. A.; SIEGEL, E. M.; UNGER, E. R. Human papillomavirus and molecular considerations for cancer risk. **Cancer**, v. 113, n. 10 Suppl, p. 2981–2994, 2008.
- WILSON, H. M. SOCS proteins in macrophage polarization and function. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 7, p. 1–5, 2014.
- WILSON, V. G. et al. Papillomavirus E1 proteins: Form, function, and features. **Virus Genes**, v. 24, n. 3, p. 275–290, 2002.
- XU, Q. et al. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. **Oncogene**, v. 24, n. 36, p. 5552–5560, 2005.
- YEE, C. et al. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. **The American Journal of Pathology**, v. 119, n. 3, p. 361–366, 1985.
- YUAN, H. et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins upregulate c-IAP2 gene expression and confer resistance to apoptosis. **Oncogene**, v. 24, p. 5069–5078, 2005.
- ZHAI, X. et al. Inhibition of LDH-A by oxamate induces G2/M arrest, apoptosis and increases radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells. **Oncology reports**, v. 30, n. 6, p. 2983–2991, 2013.
- ZHANG, B. et al. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon- γ . **Virology**, v. 310, n. 1, p. 100–108, 2003.
- ZHAO, Y. et al. Bladder cancer cells re-educate TAMs through lactate shuttling in the microfluidic cancer microenvironment. **Oncotarget**, v. 6, n. 36, p. 39196–39210, 2015a.
- ZHAO, Z. et al. Oxamate-mediated inhibition of lactate dehydrogenase induces protective autophagy in gastric cancer cells : Involvement of the Akt – mTOR signaling pathway. **Cancer Letters**, v. 358, n. 1, p. 17–26, 2015b.
- ZHONG, H. et al. Modulation of Hypoxia-inducible Factor 1 α Expression by the Epidermal Growth Factor / Phosphatidylinositol 3-Kinase / PTEN / AKT / FRAP Pathway in Human Prostate Cancer Cells : Implications for Tumor Angiogenesis and Therapeutics. **Cancer research**, v. 60, n. 6, p. 1541–1545, 2000.
- ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, 2002.