

FLÁVIA SARDELA DE MIRANDA

**Efeitos do bloqueio de transportadores de
monocarboxilatos sobre células tumorais e macrófagos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

São Paulo

2020

FLÁVIA SARDELA DE MIRANDA

**Efeitos do bloqueio de transportadores de
monocarboxilatos sobre células tumorais e macrófagos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Lepique

Versão original

São Paulo

2020

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)

Miranda, Flávia Sardela de
Efeitos do bloqueio de transportadores de
monocarboxilatos sobre células tumorais e macrófagos
/ Flávia Sardela de Miranda; orientadora Ana Paula
Lepique. -- São Paulo, 2020.
125 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Células tumorais. 2. Macrófagos. 3. Lactato.
4. Transportadores de monocarboxilatos. 5.
Metabolismo. I. Lepique, Ana Paula, orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Flávia Sardela e Miranda

Título da Dissertação/Tese: Efeitos do bloqueio de transportadores de monocarboxilatos sobre células tumorais e macrófagos

Orientador: Ana Paula Lepique

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 28 de fevereiro de 2018.

PARECER 1377/CEPSH

CAAE nº 82671818.4.0000.5467

Protocolo CEPSH-ICB nº 1419/18

O Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "***O bloqueio crônico da produção e transporte de lactato e efeitos sobre macrófagos no microambiente tumoral.***", das pesquisadoras Profa. Dra. **Ana Paula Lepique** e da aluna Flávia Sardela de Miranda.

Caberá às pesquisadoras elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: ww2.icb.usp.br/icb/cepsb, como também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto. O primeiro relatório deverá ser enviado, via Plataforma Brasil, até **28/02/2019**.

Atenciosamente,

Prof. Dra. **CAMILA SQUARZONI DALE**
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 22 de abril de 2019.

PARECER 1438/CEPSH

CAAE nº 06373918.1.0000.5467
Protocolo CEPSH-ICB nº 1475/19

O Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, em 22/04/2019, **APROVOU** o projeto intitulado: "**Avaliação do potencial imunomodulador de células mielóides circulantes de pacientes com câncer cervical**", das pesquisadoras: **Ana Paula Lepique e Flavia Sardela**.

Caberá aos pesquisadores, em conformidade com a Resolução CNS nº 466/2012: 1) elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) conforme modelo constante no site: ww2.icb.usp.br/icb/cepsh; 2) desenvolver o projeto conforme metodologia apresentada; 3) manter em arquivo sob sua guarda (impresso ou digital), por até 5 anos após conclusão da pesquisa, toda documentação relacionada a pesquisa; 4) encaminhar os resultados para publicação; 5) justificar ao CEP, via Plataforma Brasil, interrupção do projeto ou a não publicação de resultados; 6) finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto. O primeiro relatório deverá ser enviado, via Plataforma Brasil, até **22/04/2020**.

Atenciosamente,

Profa. Dra. **CAMILA SQUARZONI DALE**
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Dedico este trabalho à todas as pessoas que
contribuíram para a finalização desta etapa, seja ao oferecer
conhecimento, ouvido, palavras ou um sorriso.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me proporcionado trilhar este caminho tão rico em aprendizados. No mestrado pude ganhar conhecimentos teóricos de imunologia, mas o saldo da experiência foi muito além disso.

À toda a minha família, em especial meus pais, Vanderli e José Carlos, que me apoiaram durante toda a minha vida em tudo que eu sonhasse fazer. Obrigada por, além disso, também sempre aplaudirem em pé qualquer fosse o resultado. É tudo graças a vocês.

Ao meu irmão e minha cunhada, Fabio e Sarah, por representarem família em São Paulo, e por todas as caronas que dividimos. Nenhuma estrada é longa demais se estivermos juntos.

Ao João Pedro, por ter ficado ao meu lado em todas os momentos e situações – inclusive nos dias em que precisei ficar até mais tarde no laboratório. Você sempre esteve presente, me esperando com um sorriso. Obrigada por trazer mais leveza para a minha vida. Que eu possa fazer o mesmo por você, sempre.

À Giovanna, que dividiu comigo muito mais do que uma casa nesses dois anos. Você me ouviu, ajudou, estimulou e apoiou incontáveis vezes, e eu serei eternamente grata à isso e à sorte que tive quando o destino uniu a gente. Que nossos caminhos nunca se desencontrem.

À Luna, minha fiel companheira, que esteve comigo durante o processo da escrita da dissertação, trazendo tranquilidade e alegria todos os dias.

Aos meus amigos Karla, Franciana, Gabriele, Fernanda, Guilherme, Luís Felipe, Sofia, Mariana, Igor e Larissa, que me motivaram sempre e fizeram o caminho ser muito mais divertido e especial.

Aos colegas do laboratório de Imunomodulação, Mariana, Caio, Gretel, Victor, Emily e Sandra, por toda a ajuda nos experimentos e pelo companheirismo. Vocês podem contar comigo para tudo, assim como sempre pude contar com vocês.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas e a todos os funcionários e doadores voluntários do departamento de Imunologia. Vocês tornaram este trabalho possível. É muito bom trabalhar em um ambiente com tantas pessoas verdadeiramente dedicadas à ciência.

Finalmente, agradeço à professora Ana Paula Lepique, por todo o tempo dedicado ao meu crescimento profissional e, talvez mesmo sem saber, pessoal. Você é um exemplo de pesquisadora, e eu não poderia ser mais grata por ter tido a oportunidade de trabalhar com você. Obrigada por ter me ensinado tanto, sobre tantas coisas.

Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

Miranda FS. Efeitos do bloqueio de transportadores de monocarboxilatos sobre células tumorais e macrófagos [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2020.

Células tumorais apresentam diversas características diferentes de células normais, como a proliferação anormal, maior sobrevivência e maior demanda metabólica. Tumores frequentemente realizam glicólise aeróbica, fenômeno conhecido como “efeito Warburg”, o qual consiste em um maior fluxo glicolítico, que disponibiliza a energia e substratos necessários para a células continuarem a se dividir. Porém, dependendo das alterações genéticas, localização no tumor e disponibilidade de nutrientes, estas células podem favorecer diferentes vias para obter os substratos necessários à sua atividade e sobrevivência. Por exemplo, já foi demonstrado que a existência de regiões oxigenadas e hipóxicas dentro do tumor pode favorecer um ambiente simbiótico entre as células, onde as células hipóxicas glicolíticas secretam lactato, o qual pode ser utilizado na oxidação fosforilativa pelas células oxigenadas no lugar da glicose, disponibilizando mais desse substrato para outras células. Além de ser utilizado como fonte de carbono pelas células tumorais, o lactato também exerce efeito imunossupressor sobre células do sistema imune, como os macrófagos, uma das populações de células imunes que infiltra os tumores e normalmente está associada a mau prognóstico. Com efeito, estudos prévios do laboratório mostraram que a diminuição da concentração de lactato em coculturas de células tumorais e macrófagos resultou em diminuição da expressão de marcadores de fenótipo M2 nestas células. Sabendo que as células tumorais utilizam o transportador de monocarboxilatos (MCT) do tipo 1 para exportar ou importar lactato, neste estudo nós objetivamos testar a hipótese de que o tratamento simultâneo de células tumorais e macrófagos com ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHC), um inibidor de MCT1, causaria prejuízo às células tumorais e diminuiria os efeitos imunossupressores sobre macrófagos. Nossos resultados mostram que, de fato, o CHC causou diminuição da viabilidade das células tumorais sem acarretar o mesmo efeito aos macrófagos. Mais do que isso, o tratamento diminuiu a morte dos macrófagos e, apesar destas células causarem aumento da viabilidade das células tumorais, com ou sem tratamento com CHC, o uso do inibidor na cocultura mesmo assim resultou em menor viabilidade das células tumorais, em comparação a cocultura controle. A tendência de aumento das concentrações extracelulares de lactato com o tratamento indica que os efeitos foram

mediados pela inibição do importe de lactato pelo MCT1, porém, mais estudos são necessários para elucidar completamente os mecanismos envolvidos nesta resposta.

Palavras-chave: Células tumorais. Macrófagos. Lactato. Transportadores de monocarboxilatos. Metabolismo.

ABSTRATC

Miranda FS. Effects of the blockade of monocarboxylate transportes on tumor cells and macrophages [dissertation (Master thesis in immunology)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2020.

Tumor cells have several different characteristics than normal cells, such as abnormal proliferation, greater survival and greater metabolic demand. Tumors often perform aerobic glycolysis, a phenomenon known as the "Warburg effect", which consists of a greater glycolytic flow, which provides the necessary energy and substrates for cells to continue dividing. However, depending on genetic changes, location in the tumor and availability of nutrients, these cells can favor different pathways to obtain the substrates necessary for their activity and survival. For example, it has been shown that the existence of oxygenated and hypoxic regions within the tumor can favor a symbiotic environment between cells, where hypoxic glycolytic cells secrete lactate, which can be used in oxidative phosphorylation by oxygenated cells instead of glucose, making more of this substrate available to other cells. In addition to being used as a carbon source by tumor cells, lactate also has an immunosuppressive effect on cells of the immune system, such as macrophages, one of the populations of immune cells that infiltrates tumors and is usually associated with a poor prognosis. Indeed, previous laboratory studies have shown that the decrease in lactate concentration in cocultures of tumor cells and macrophages has resulted in decreased expression of M2 phenotype markers in these cells. Knowing that tumor cells use the type 1 monocarboxylate transporter (MCT) to export or import lactate, in this study we aim to test the hypothesis that the simultaneous treatment of tumor cells and macrophages with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHC), an inhibitor of MCT1, would cause damage to tumor cells and decrease the immunosuppressive effects over macrophages.

Our results show that, in fact, CHC reduced the viability of tumor cells without causing the same effect to macrophages. More than that, the treatment decreased the death of the macrophages and, although these cells cause increased viability of the tumor cells, with or without treatment with CHC, the use of the inhibitor in the coculture resulted in decreased viability of the tumor cells, in comparison to the control coculture. The tendency to increase extracellular lactate concentrations with the treatment indicates that the effects were mediated by the inhibition of lactate import by MCT1, however, further studies are needed to fully elucidate the mechanisms involved in this response.

Keywords: Tumor cells. Macrophages. Lactate. Monocarboxylate transporters. Metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumo das principais vias metabólicas em células humanas e representação das vias favorecidas em células tumorais.....	22
Figura 2. Porcentagem de células CD11b positivas.....	37
Figura 3. Cocultura de células tumorais com monócitos.....	38
Figura 4. Fotografias de esferoides e macrófagos por microscopia de luz invertida.....	39
Figura 5. Linha do tempo ilustrativa da estratégia de tratamento com os inibidores.....	40
Figura 6. Linha do tempo ilustrativa dos experimentos de cinética com Anexina V e 7AAD.....	42
Figura 7. Estratégia de <i>gates</i> da monocultura de macrófagos, referente aos experimentos do bloco I - Fenotipagem e avaliação de viabilidade, seis dias após o tratamento com CHC.....	45
Figura 8. Estratégia de <i>gates</i> da monocultura de células tumorais dos experimentos do bloco I - Fenotipagem e avaliação de viabilidade, seis dias após o tratamento com CHC.....	46
Figura 9. Estratégia de <i>gates</i> das células da cocultura dos experimentos do bloco I - Fenotipagem e avaliação de viabilidade, seis dias após o tratamento com CHC.....	47
Figura 10. Esquema ilustrativo do delineamento de populações nas culturas.....	48
Figura 11. Estratégia de <i>gates</i> das células dos experimentos do bloco II - Avaliação da cinética de apoptose e necrose e comparação do CHC com o AZD 3965.....	50
Figura 12. Médias das frequências de células nas coculturas e viabilidade média de células nas coculturas e monoculturas, após a adição de diferentes concentrações do solvente DMSO....	54
Figura 13. Tamanho e granulosidade de células da cocultura de esferoides tumorais com macrófagos após tratamento com diferentes concentrações de CHC.....	55
Figura 14. Tamanho e granulosidade de células das monoculturas de células tumorais e macrófagos com 0,27% DMSO e 8 mM de CHC.....	56
Figura 15. Tamanho e granulosidade de células das monoculturas de células tumorais e macrófagos com 0,13% DMSO e 4 mM de CHC.....	57
Figura 16. Tamanho e granulosidade de células das monoculturas de macrófagos com 0,065% DMSO e 2 mM de CHC.....	57
Figura 17. Tamanho, granulosidade e frequência de células nas coculturas para avaliação do efeito de diferentes concentrações de AZD 3965.....	59
Figura 18. Tamanho, granulosidade e frequência de células nas coculturas de células tumorais com macrófagos.....	60
Figura 19. Frequências e números absolutos de células CD45+/CD14- (MAC CD14- e TUMOR autofluorescente) na cocultura de células tumorais com macrófagos.....	61
Figura 20. Frequências e número absolutos de células tumorais totais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) na cocultura de esferoides com macrófagos.....	62
Figura 21. Frequências e número absolutos de macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-) na cocultura de esferoides com macrófagos.....	63
Figura 22. Frequências e número absolutos de células tumorais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) e macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-) em suas respectivas monoculturas.....	65

Figura 23. Frequência de células tumorais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) e macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-) vivos nas monoculturas e coculturas.	67
Figura 24. Razão da frequência de células tumorais mortas com o tratamento com CHC em relação ao controle de solvente (DMSO) na cocultura e monocultura de células tumorais.	69
Figura 25. Frequência e número absoluto de células das subpopulações de macrófagos na cocultura e monocultura.	71
Figura 26. Expressão de CD14 na subpopulação MAC CD14+ da monocultura e cocultura.	74
Figura 27. Frequência e expressão de HLA-DR e CD86 pela subpopulação MAC CD14+ da monocultura e cocultura.	76
Figura 28. Frequência e expressão de HLA-DR e CD86 por células da subpopulação MAC CD14- da monocultura e cocultura.	78
Figura 29. Frequência de células CD45+/CD14- (MAC CD14+ e TUMOR autofluorescente) na cocultura de células tumorais com macrófagos, em três e seis dias.	80
Figura 30. Frequência de células tumorais (TUMOR CD45-) vivas e MAC CD14+ nas coculturas, em três e seis dias.	81
Figura 31. Frequência de células tumorais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) vivas e mortas e frequência das subpopulações de macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-) nas monoculturas, em três e seis dias.	83
Figura 32. Frequência de células tumorais TUMOR CD45- vivas, em apoptose ou mortas na cocultura, em três e seis dias.	85
Figura 33. Frequência de células tumorais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) vivas, em apoptose e mortas na monocultura, em três e seis dias.	86
Figura 34. Frequência de macrófagos CD14+ vivos, em apoptose e mortos na cocultura, em três e seis dias.	88
Figura 35. Frequência de macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-) vivos, em apoptose e mortos na monocultura, em três e seis dias.	90
Figura 36. Frequência das subpopulações de células nas coculturas de células tumorais com macrófagos após os diferentes tratamentos.	92
Figura 37. Frequência das subpopulações de células nas monoculturas de células tumorais e macrófagos após os diferentes tratamentos.	93
Figura 38. Concentrações extracelulares de lactato nas monoculturas e coculturas, nas condições controle de solvente (DMSO) e tratadas com CHC.	95
Figura 39. Concentrações extracelulares de lactato nas monoculturas e coculturas, nas condições controles e tratadas com CHC ou AZD.	97
Figura 40. Frequência e número absoluto de células CD45+/CD14- na cocultura de células tumorais com macrófagos de doadores saudáveis e pacientes com câncer do colo do útero.	99
Figura 41. Frequência e número absoluto de células tumorais TUMOR CD45- vivas na cocultura de células tumorais com macrófagos de doadores saudáveis e pacientes com câncer do colo do útero.	100
Figura 42. Frequência e número absoluto de células tumorais TUMOR CD45- vivas na cocultura de células tumorais com macrófagos de doadores saudáveis e pacientes com câncer do colo do útero, amostra por amostra.	101
Figura 43. Frequência e número absoluto de macrófagos CD14+ na cocultura de células tumorais com macrófagos de doadores saudáveis e pacientes com câncer do colo do útero.	102

Figura 44. Frequência e número absoluto de macrófagos CD14+ na cocultura de células tumorais com macrófagos de doadores saudáveis e pacientes com câncer do colo do útero, amostra por amostra..... 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias e desvios padrões das frequências (%) de células nas coculturas.	63
Tabela 2. Médias e desvios padrões dos números absolutos de células nas coculturas.	64
Tabela 3. Médias e desvios padrões das frequências (%) de células nas monoculturas.	66
Tabela 4. Médias e desvios padrões dos números absolutos de células nas monoculturas.	66
Tabela 5. Médias e desvios padrões das frequências (%) de células vivas (DAPI).	68
Tabela 6. Médias e desvios padrões das frequências (%) das subpopulações de macrófagos na monocultura e cocultura.	72
Tabela 7. Médias e desvios padrões dos números absolutos das subpopulações de macrófagos na monocultura e cocultura.	72
Tabela 8. Médias e desvios padrões das frequências (%) de células da subpopulação TUMOR CD45- vivas, em apoptose e mortas na cocultura.	84
Tabela 9. Médias e desvios padrões das frequências (%) de células tumorais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) vivas, em apoptose e mortas na monocultura.	86
Tabela 10. Médias e desvios padrões das frequências (%) das células da população MAC CD14+ vivas, em apoptose e mortas na cocultura.	87
Tabela 11. Médias e desvios padrões das frequências (%) de macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-) vivos, em apoptose e mortos nas monoculturas.	89
Tabela 12. Médias e desvios padrões dos valores referentes a concentração extracelular de lactato (mg x dL-1) nas monoculturas e coculturas.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7AAD - 7-aminoactinomicina D
Acetil-CoA - acetilcoenzima A
Akt – proteína quinase B
ANOVA – Análise de Variância
ATCC – American Type Culture Collection
ATP - adenosina trifosfato
AZD – AZD 3965
bFGF – fator de crescimento básico de fibroblastos
CD11b – integrina alfa M, expressa em fagócitos mononucleares, neutrófilos, mastócitos e células NK
CD14 – co-receptor de LPS, expresso em monócitos, macrófagos e neutrófilos
CD45 – receptor de tirosina fosfatase, expresso em todas as células hematopoéticas
CD86 – molécula coestimulatória, expressa em células dendríticas ativadas, macrófagos e linfócitos B
CHC – ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
CIN – neoplasia intraepitelial cervical
CTRL – controle
DAPI – 4', 6-diamidino-2-fenilindole
DMSO – dimetilsulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucleico
FADH₂ – dinucleotídeo de flavina e adenina reduzido
FSC – *forward scatter*
GLUT1 – transportador de glicose 1
GM-CSF – fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos
GPR - receptores acoplados à proteína G
HK – hexoquinase
HKII – hexoquinase II
HLA - antígeno leucocitário humano
HPV - Papilomavírus Humano
hTERT - telomerase reversa da transcriptase
ICESP – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IFN – interferon
IL - interleucina
K-ras – homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato de Kirsten
LDH – lactato desidrogenase
LDHA – lactato desidrogenase A
LPS – lipopolissacarídeo
M-CSF – fator estimulante de colônias de macrófagos
MCT – transportador de monocarboxilatos
MFI – mediana da intensidade de fluorescência
mTOR – proteína alvo da rapamicina
mTORC1 – complexo 1 da proteína alvo da rapamicina
NAD⁺ - dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidada
NADH – dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida
NADPH – fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida
NK – célula *Natural Killer*

NO – óxido nítrico
PBMC – células mononucleares do sangue periférico
PBS – tampão fosfato salino
PDK1 – piruvato desidrogenase quinase 1
PFK – fosfofrutoquinase
PGE2 – prostaglandina E2
pH – potencial hidrogeniônico
PI3K – fosfatidilinositol 3-quinase
PKM2 – piruvato quinase M2
PPP - via das pentoses-fosfato
pRB – proteína do retinoblastoma
RNA – ácido ribonucleico
RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro
ROS - espécies reativas de oxigênio
SFB – soro fetal bovino
SSC – *side scatter*
TAM - macrófagos associados a tumores
TNF – fator de necrose tumoral
Treg - linfócito T regulador
USP – Universidade de São Paulo
VEGFR2 – receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Câncer e metabolismo	19
1.2	Câncer do colo uterino	24
1.3	Metabolismo de células imunes	26
1.3.1	Macrófagos no microambiente tumoral	27
1.4	Lactato e seus efeitos sobre células imunes	30
1.4.1	Transportadores de monocarboxilatos	32
2	OBJETIVOS	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1	Casuística	36
3.2	Enriquecimento de monócitos humanos	36
3.3	Linhagens tumorais	37
3.4	Geração dos esferoides tumorais e cocultura com monócitos (condição não tratada)	38
3.5	Tratamento das culturas	39
3.5.1	Curva dose-resposta dos inibidores	40
3.6	Fenotipagem e avaliação de viabilidade, seis dias após o tratamento com CHC ..	41
3.7	Avaliação da cinética de apoptose e necrose e comparação do CHC com o AZD 3965	42
3.8	Estratégia de <i>gates</i> por citometria de fluxo	43
3.8.1	Bloco I: Fenotipagem e avaliação de viabilidade, seis dias após o tratamento com CHC.....	43
3.8.2	Bloco II: Avaliação da cinética de apoptose e necrose e comparação do CHC com o AZD 3965	48
3.9	Quantificação de lactato extracelular	51
3.10	Avaliação dos efeitos do CHC sobre coculturas de células tumorais da linhagem HeLa e monócitos de doadores saudáveis e pacientes	51
3.11	Análise estatística	51
4	RESULTADOS	53
4.1	Padronização das doses dos inibidores (CHC e AZD 3965)	53
4.2	O tratamento com CHC causa a morte de células tumorais, mas não prejudica a viabilidade de macrófagos.	59

4.3	O tratamento com CHC altera tamanho, granulosidade e expressão de CD14 dos macrófagos.	70
4.4	O CHC diminui a expressão de HLA-DR e CD86 em macrófagos na monocultura em relação aos controles, porém, o efeito é perdido na cocultura.....	74
4.5	O efeito do CHC só é significativo sobre células tumorais após seis dias de tratamento.	79
4.6	Análise da marcação por Anexina V e 7AAD em macrófagos e células tumorais.	83
4.7	O tratamento de coculturas e monoculturas de células tumorais e macrófagos com 50 nM AZD3965 não apresenta o mesmo resultado do tratamento com 2 mM CHC.	90
4.8	Avaliação dos efeitos do CHC sobre coculturas de células tumorais da linhagem HeLa com monócitos de doadores saudáveis e pacientes com câncer do colo uterino.....	98
5	DISCUSSÃO	105
6	CONCLUSÃO.....	115
	REFERÊNCIAS	116

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um importante problema de saúde pública, estando entre as quatro principais causas de morte antes dos 70 anos de idade na maioria dos países, de acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (1). Como bem discutido por Hanahan e Weinberg, esta doença é caracterizada por diversas capacidades adquiridas pelas células tumorais em relação a células normais, como a proliferação sustentada, a evasão à sinais supressores de crescimento e a resistência à morte celular. O remodelamento metabólico acompanha e sustenta estas mudanças e, de fato, a capacidade de alteração do metabolismo é um fator importante para o desenvolvimento e progressão tumoral, também fazendo parte da lista de marcos do câncer (2).

1.1 Câncer e metabolismo

Células necessitam de energia para realizar suas funções, sendo a glicose a principal fonte dos substratos necessários para a produção de adenosina trifosfato (ATP); além disso, as células também utilizam lipídeos e aminoácidos para gerar energia e obter biomoléculas para o seu crescimento, quando estão em proliferação (3). A glicose é metabolizada por meio da glicólise, resultando em duas moléculas de piruvato e cofatores reduzidos. Em células normais, o piruvato é principalmente utilizado para gerar acetilcoenzima A (acetil-CoA), que entra no ciclo de Krebs e causa a geração de mais cofatores reduzidos, os quais transferem elétrons para a cadeia de oxidação fosforilativa para a produção de ATP (4). Enquanto isso, em muitos tumores as células tumorais, além de aumentarem a taxa glicolítica, metabolizam o piruvato em lactato, mesma na presença de oxigênio, consumindo grandes quantidades de glicose e secretando altas taxas de lactato, como descrito por Otto Warburg (5). Esta via metabólica resulta em uma menor produção de ATP/molécula de glicose, porém, a “perda” energética é compensada através de um maior fluxo glicolítico (4). De fato, o aumento da utilização de glicose foi documentada em vários tipos de tumores (revisto por (2)). Este fenômeno é atingido através da sinalização de diversas vias, estando associado com a hipóxia, atividade de quinases como a proteína alvo mecanístico da rapamicina (mTOR), ativação de oncogenes e mutação de genes supressores de tumor (3, 5), que culminam em maior fluxo glicolítico ao aumentar a expressão do transportador

de glicose 1 (GLUT1) e de enzimas glicolíticas, além de interferir com enzimas e limitar substratos essenciais para a oxidação fosforilativa, como discutido nos exemplos a seguir.

A cascata de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B/proteína alvo mecanístico da rapamicina (PI3K/Akt/mTOR) está frequentemente mutada em diversos tumores, como revisto por Liu e colaboradores (6). A ativação desta via causa aumento dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) e proteína GLUT1, e promove a translocação deste transportador para a membrana celular, aumentando a captação de glicose (7, 8). Além disso, esta via também exerce efeitos sobre enzimas glicolíticas: Akt potencializa a atividade das enzimas hexoquinase (HK), a qual fosforila moléculas de glicose (9), e fosfofrutoquinase (PFK), que catalisa a etapa irreversível da glicólise (10); por sua vez, mTOR causa aumento da expressão de piruvato quinase M2 (PKM2), uma enzima glicolítica que causa acúmulo de intermediários carboxílicos, facilitando a biossíntese de macromoléculas para a proliferação tumoral (11, 12). A via de PI3K/Akt/mTOR também é capaz de favorecer a glicólise ao interagir com enzimas relacionadas com a oxidação fosforilativa. Um exemplo é o acúmulo de Akt ativa que ocorre na mitocôndria durante a hipóxia, a qual fosforila a piruvato desidrogenase quinase 1 (PDK1), que por sua vez inativa piruvato desidrogenase, resultando em inibição da conversão de piruvato em acetil-CoA, limitando um substrato essencial para o ciclo de Krebs, com consequente desvio do metabolismo para a glicólise (13). Ademais, a sinalização por PI3K/Akt/mTOR também pode controlar a expressão de genes relacionados a glicólise; por exemplo, a expressão de proteínas glicolíticas mediadas por mTOR envolve a ativação do fator induzível por hipóxia 1α (HIF- 1α) (14) e c-Myc (15, 16).

O aumento da expressão e a estabilização do fator de transcrição HIF- 1α em resposta a diversos fatores, como a ativação de mTOR (17, 18) e a hipóxia [revisto por (19)], induz a transcrição de GLUT-1 e de lactato desidrogenase A (LDHA) (20, 21). A LDHA catalisa a transformação de piruvato em lactato e o aumento da expressão desta enzima é importante para regenerar o dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidada (NAD^+ , um importante cofator para a glicólise) através do dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida (NADH) utilizado na reação, já que em células normais NAD^+ é regenerado a partir da oxidação fosforilativa (9). Além disso, HIF- 1α também potencializa a transcrição das enzimas hexoquinase II (HK II), PDK1 e PKM2 (22-25) e controla a respiração mitocondrial através da regulação da expressão de fatores envolvidos com esta via, como citocromo c oxidase e microRNAs que interferem com a expressão de enzimas do ciclo de Krebs, sobre o que é possível encontrar mais detalhes na revisão de Iurlaro e colaboradores (26).

Mutações e alterações de expressão de oncogenes e genes supressores tumorais também podem favorecer o metabolismo glicolítico (19). O oncogene K-Ras mutado leva a aumento da expressão de GLUT-1 (27). Enquanto isso, o fator de transcrição c-Myc promove o aumento da expressão de GLUT1 (23, 28), além de potencializar a transcrição das enzimas glicolíticas HKII, PFK e LDHA (23, 29) e aumentar a expressão de transportadores de monocarboxilatos (MCTs) (30), mais discutidos adiante neste trabalho. Interessantemente, o supressor tumoral p53 regula negativamente a glicólise, contribuindo para a reprogramação metabólica tumoral, promovendo a oxidação fosforilativa (31, 32). A p53 diminui a expressão de GLUT1, 3 e 4 (33, 34) e regula negativamente a via de PI3K/Akt/mTOR (35, 36). Considerando a alta taxa mutacional de p53 em tumores humanos, a perda da função de p53 é um fator importante que contribui para o efeito Warburg (19).

Sendo assim, em resposta a diferentes condições e estímulos derivados do microambiente tumoral, estas células conseguem aumentar seu fluxo glicolítico, elevando a taxa de geração de ATP. O aumento da captação e metabolização de glicose favorece também as vias biossintéticas; como comentado, mTOR e HIF1- α aumentam a expressão de PKM2, a qual aumenta a disponibilidade de intermediários carboxílicos. Além disso, outras vias também são favorecidas por esse fenômeno, como a via das pentoses-fosfato (PPP); a ativação do complexo 1 de mTOR (mTORC1) causa aumento da expressão de genes envolvidos com esta via, a qual utiliza intermediários glicolíticos para gerar poder redutor na forma de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida (NADPH, importante em processos biossintéticos e no balanço do estado de redução-oxidação da célula (4)), e precursores de RNA e DNA (19). Outra importante diferença do metabolismo de células altamente proliferativas, em relação às células quiescentes, é que muito do carbono que não é convertido em lactato para ser exportado e entra no ciclo de Krebs é utilizado para suprir as vias biossintéticas, as quais consomem ATP, ao invés de gerá-lo. Desta forma, importantes vantagens, além da geração de ATP, surgem através da glicólise: são geradas substâncias intermediárias necessárias para as vias biossintéticas, como os açúcares ribose para a formação de nucleotídeos, o glicerol e o citrato para a formação de lipídeos, os aminoácidos não essenciais para a síntese de proteínas, e o NADPH; dessa forma, o efeito de Warburg beneficia a via bioenergética e biossintética da célula (37). A **Figura 1** ilustra as principais vias metabólicas em células humanas, e as principais mudanças em células tumorais glicolíticas.

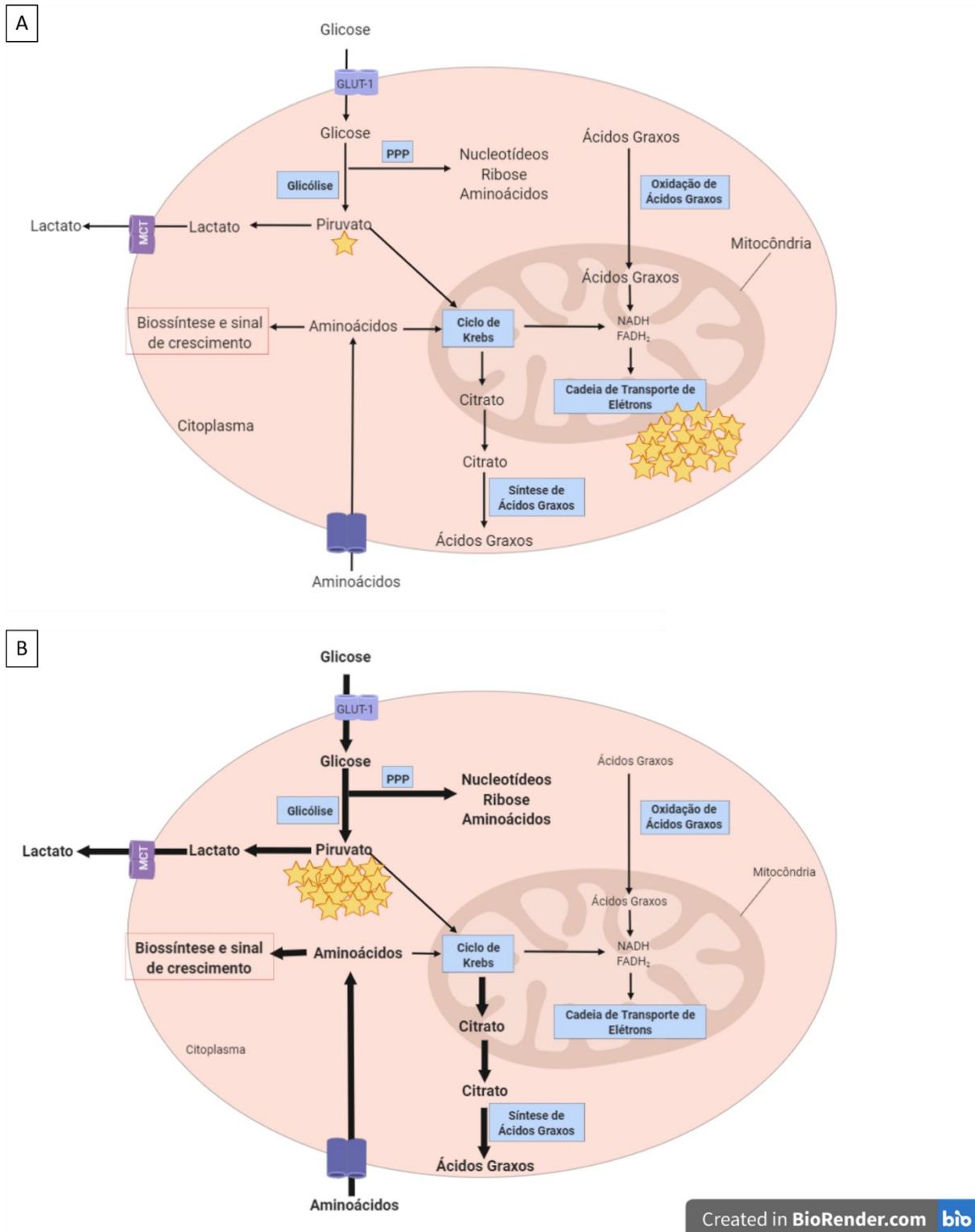


Figura 1. Resumo das principais vias metabólicas em células humanas e representação das vias favorecidas em células tumorais.

A figura inspirada no artigo de O'Neill e colaboradores (38) esquematiza, de forma simplificada, as principais vias metabólicas em atividade em células humanas (A) e as vias favorecidas em células tumorais glicolíticas (B). As estrelas representam de forma qualitativa a proporção de ATP produzida em cada processo. A utilização de letras em negrito e setas mais espessas indicam as vias favorecidas na figura B.

(A) A glicose, captada pela célula através de GLUT-1, é convertida para piruvato através da glicólise, gerando ATP. O piruvato pode ser convertido em lactato e secretado para o meio extracelular (através dos MCTs) ou entrar no ciclo de Krebs, gerando NADH e FADH₂ para a cadeia de transporte de elétrons, produzindo ATP. A glicólise também alimenta a via das pentoses-fosfato (PPP), a qual gera ribose para compor os nucleotídeos, aminoácidos e NADPH. O NADPH é utilizado para realizar a síntese de ácidos graxos, processo que utiliza citrato advindo do ciclo de Krebs, ou para reduzir espécies reativas de oxigênio, contribuindo para o equilíbrio do estado redutivo-oxidativo da célula. Os ácidos graxos também podem ser oxidados, gerando NADH e FADH₂, que levam a produção de ATP. Por fim, os aminoácidos podem alimentar o ciclo de Krebs e são importantes para o crescimento celular e a síntese de proteínas.

(B) Em grande parte das células tumorais altamente proliferativas, a via glicolítica é favorecida, com a maior parte da glicose sendo convertida para lactato ou utilizada para gerar substratos para biossíntese através da PPP. Além disso, o citrato gerado no ciclo de Krebs é utilizado para a síntese de ácidos graxos, e os aminoácidos são utilizados para a síntese de proteínas, ao invés de contribuírem para a geração de ATP por meio da cadeia transportadora de elétrons.

Criado com BioRender.

Apesar de muitos tumores apresentarem perfil glicolítico, o que traz muitas vantagens para as células tumorais, agora também se sabe que o tumor pode apresentar regiões onde predominam vias metabólicas diferentes, dependendo da disponibilidade de substratos, por exemplo. Como demonstrado por Sonveaux e colaboradores, pode existir no tumor uma simbiose, onde as células tumorais das regiões hipóxicas são glicolíticas, enquanto as células tumorais das regiões oxigenadas priorizam a oxidação fosforilativa, consumindo lactato para suprir a demanda por carbono do ciclo de Krebs, ao invés de glicose, disponibilizando este substrato para as células hipóxicas. A oxidação do lactato para piruvato, para utilização no ciclo de Krebs, resulta em produção de agentes redutores que podem amenizar o estresse oxidativo tumoral e ativar vias de sinalização de sobrevivência. Além disso, a oxidação de lactato não requer a energia inicial que é necessária para produzir ATP através da glicólise e poupa a energia que normalmente é gasta com enzimas glicolíticas. Sendo assim, a oxidação fosforilativa, alimentada por lactato, também é um processo metabólico que pode ser assumido pelas células tumorais e favorecer a progressão tumoral, em condições aeróbicas (39).

Tendo em vista estas diferenças metabólicas entre células normais e cancerígenas, o estudo de intervenções no metabolismo de células tumorais se mostra como um campo promissor. Dados prévios do laboratório mostram que os níveis séricos de lactato em pacientes com câncer do colo uterino são mais altos do que em indivíduos saudáveis, e que a expressão de Akt fosforilada (marcador de ativação da via de PI3K/Akt) também estava aumentada nas células tumorais (40), sugerindo que a via glicolítica está ativada neste tipo de câncer, o que o torna um bom modelo para estudar intervenções metabólicas.

1.2 Câncer do colo uterino

O câncer do colo do útero corresponde ao quarto câncer mais comum em mulheres no Brasil e no mundo (1, 41). A incidência desta doença tem decaído na maioria dos países, devido a detecção de lesões pré-malignas através de rotina regular de exames, porém foi observado aumento das taxas de incidência em gerações de mulheres mais novas em alguns países (42) e portanto, o câncer do colo uterino continua a ser um problema em diversos sistemas de saúde pelo mundo, principalmente em países subdesenvolvidos (1). A infecção persistente do colo do útero por Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco oncogênico é a principal causa desta doença e suas lesões precursoras (43). De fato, já foi anteriormente demonstrado que o HPV está presente em 99,7% dos cânceres do colo uterino (44). A infecção cervical com HPV é bastante comum e a maioria das mulheres consegue a eliminar naturalmente (45, 46), através de diversos mecanismos imunes, como a secreção de citocinas antivirais pelos queratinócitos (como IFN- α e IFN- β), a atividade de células NK e linfócitos T citotóxicos, entre outros (revistos por Scott e colaboradores (47)). Porém, em alguns casos, pode ocorrer a falha da eliminação da infecção, tanto em consequência das condições do organismo do paciente (por exemplo a imunossupressão (48) e, até mesmo, fatores como o polimorfismo de genes com papel na resposta imune, como HLA (49)) quanto também devido a mecanismos de evasão do vírus (50).

A família *Papillomaviridae* compreende um grupo de vírus que são capazes de infectar a pele e o epitélio mucoso de diversas espécies de vertebrados. O HPV pertence a esta família e, como o próprio nome já informa, infecta humanos (51). Este vírus possui aproximadamente 50 nm de dimensão e é composto de capsídeo proteico não envelopado e genoma de fita dupla de DNA circular. O genoma do HPV pode ser dividido em três regiões funcionais: a região não codificadora, envolvida com a regulação da transcrição e replicação viral; a região de codificação precoce, que regula as fases vegetativas e produtivas do ciclo viral e contém os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7; e, por fim, a região de codificação tardia, que codifica as proteínas do capsídeo, compreendendo os genes L1 e L2 (52).

Os HPVs possuem tropismo por células epiteliais, infectando pele e mucosa. Muitos dos tipos de HPV que infectam o epitélio e a mucosa que reveste o trato anogenital pertencem ao

gênero *α-papillomavirus* (53). O ciclo do HPV se inicia quando o vírus adentra o epitélio através de microlesões, preferencialmente na região de transição escamo-colunar (54) e infecta células indiferenciadas da camada basal do epitélio estratificado, onde mantém de 50 a 100 cópias do genoma viral. Com a divisão celular, uma célula filha permanecerá indiferenciada na camada basal do epitélio, enquanto a outra célula filha iniciará o processo de diferenciação terminal, passando a se localizar na camada suprabasal, juntamente com outras células epiteliais em diferenciação. O DNA viral irá se segregar entre as duas células filhas e se replicar para manter o número de cópias. Para continuar utilizando da maquinaria de divisão da célula em diferenciação, o HPV estimula a síntese de DNA *de novo* nessas células; desta forma, o vírus consegue continuar a duplicar seu genoma e, também, consegue produzir as proteínas do capsídeo viral, as quais são sintetizadas a partir de RNAm codificante que é ativado somente em células parcialmente diferenciadas. A transcrição e tradução dos genes tardios virais ocorrem próximo ao topo do epitélio para, por fim, ocorrer a montagem das partículas virais na camada córnea (55).

Os *α-papillomavirus* podem ser classificados de acordo com o seu potencial oncogênico em HPVs de baixo e alto risco. Enquanto os HPVs de baixo risco causam lesões hiperproliferativas benignas, como verrugas e papilomas, as infecções com HPVs de alto risco (prevalentemente com HPV16 e 18) são associadas com displasias de alto grau e câncer. As lesões precursoras de câncer causadas por HPV são denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais de alto grau (CIN 2 e 3) (53).

Os HPVs de alto risco expressam, em todas as camadas do epitélio, altos níveis de E6 e E7 (56), as quais são oncoproteínas virais capazes de imortalizar queratinócitos humanos primários (57). A proteína E6 é responsável por promover a degradação da proteína supressora de tumor p53 e ativar a expressão de hTERT, a subunidade catalítica da telomerase; já a proteína E7 se liga e inativa membros da família de susceptibilidade do retinoblastoma (pRb) (52). Além disso, essas proteínas também agem sobre outros fatores celulares, como proteínas PDZ, caspase-8 e ciclinas. Em conjunto, essas interações afetam a transcrição e diferenciação de queratinócitos, inibem a apoptose e favorecem a progressão do ciclo celular, estabelecendo as condições necessárias para sustentar a replicação viral, como revisto por Boccardo e colaboradores (58). Quando ocorre o evento de integração do DNA viral no DNA do hospedeiro, o resultado pode ser a desregulação da expressão dos oncogenes virais E6 e E7, os quais passam a ter expressão constitutiva, dando vantagem seletiva de crescimento para a célula infectada e mediando a oncogênese (59, 60). Além de todos esses fatores com potencial oncogênico, estes vírus ainda

possuem mecanismos de evasão da resposta imune, como a indução da produção de citocinas reguladoras (61) e da regulação negativa da expressão do receptor do tipo *Toll* (*Toll-Like*) 9 (62), a interrupção de vias sensíveis ao IFN do tipo I (63-66), a restrição da replicação viral a sítios anatômicos específicos, a ausência de lise celular após a infecção da célula e a baixa expressão de proteínas virais (67), eventos detalhadamente revisados no trabalho de Boccardo *et al.* (58). Todos esses fatores poderão resultar na persistência da infecção, possivelmente resultando em lesões malignas (44).

A avaliação do *status* metabólico de diferentes linhagens celulares derivadas de câncer do colo uterino revelou que a linhagem C33A (que não possui DNA de HPV, mas possui mutações em p53 e pRb (68)) apresenta forte relação negativa entre a concentração de glicose e lactato nos sobrenadantes de sua cultura. Já as outras linhagens testadas – HeLa e SW756, que foram transformadas por HPV18, e SiHa e CaSKi, que foram transformadas por HPV 16 - não apresentaram tal relação. A inibição nestas células da síntese de lactato causou diminuição na concentração extracelular de lactato nos sobrenadantes de SW756 e C33A, enquanto causou aumento da concentração extracelular de glicose nos sobrenadantes de SiHa e C33A. Estes resultados indicam que a linhagem HPV negativa, C33A, é a mais dependente da glicólise (de fato, a inibição da glicólise utilizando 3-bromopiruvato causou a morte de 95% destas células) enquanto as células HPV positivas realizam glicólise aeróbica (como evidenciado pela quantificação de lactato nos sobrenadantes de cultura) e oxidação fosforilativa, apresentando maior facilidade de adaptação metabólica (Stone *et al.*, 2017, dados não publicados). Considerando que na clínica 99,7% dos tumores de cérvix uterina são HPVs positivos, é muito importante considerar a plasticidade metabólica destas células quando na busca de estratégias terapêuticas. Além disso, é importante considerar o metabolismo das células do sistema imune, já que as mesmas exercem influência sobre a progressão tumoral (42).

1.3 Metabolismo de células imunes

Grande parte das células do sistema imune ativadas também apresentam predominância da glicólise. Além de suportar a proliferação destas células, a glicólise é crucial para a atividade funcional das mesmas, estando ligada, por exemplo, a produção de citocinas em células linfóides e mielóides (69-71). Em células mielóides em estado de ativação pró-inflamatório, a

glicólise sustenta a produção de ATP enquanto também favorece outros mecanismos, disponibilizando oxigênio e NADPH para a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) (72, 73), e causando aumento dos níveis de succinato, o qual estabiliza HIF-1 α , contribuindo para a expressão de IL-1 β (69).

Sem dúvidas, o infiltrado inflamatório e as substâncias por ele produzidas são de extrema importância no contexto do microambiente tumoral. Macrófagos correspondem a uma das maiores populações leucocitárias infiltrantes em cânceres (74), sendo que em tumores da cérvix uterina, correspondem a terceira maior população imune presente (75) e, desta forma, são capazes de exercer grande influência no tumor.

1.3.1 Macrófagos no microambiente tumoral

Diversos estudos apontam que a abundância de macrófagos no tumor correlaciona-se com angiogênese e mau prognóstico (74, 76). De fato, quanto maior o grau da lesão do colo do útero, maior o número de macrófagos presentes no ambiente tumoral (77). Macrófagos apresentam plasticidade fenotípica e funcional (78, 79) e, portanto, são capazes de realizar diversas funções, dependendo dos estímulos ambientais que recebem, existindo dois fenótipos funcionais principais: M1 e M2 (80-82), porém, esta classificação representa estados extremos dentro de uma gama de fenótipos funcionais que estas células podem assumir (78).

Estímulos como LPS e IFN- γ promovem a geração de macrófagos com fenótipo M1 (ativação clássica) que, no contexto de câncer, exercem funções antitumorais em tumores estabelecidos, como a secreção de citocinas pró-inflamatórias (como TNF, IL-12 e IL-23), a produção de ROS e NO, e a promoção de resposta Th1, sendo tipicamente citotóxicos (revisado em (83)). Já estímulos como IL-4 e IL-13 levam a geração de macrófagos com fenótipo M2 (ativação alternativa), os quais apresentam diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias e exercem funções pró-tumorais, como por exemplo a secreção de citocinas anti-inflamatórias (como IL-10) e metaloproteínas, a promoção da angiogênese e da cicatrização de feridas, e a ativação de células T regulatórias (78, 81, 84, 85). No contexto tumoral, diversos fatores secretados pelas células tumorais e pelas células do microambiente podem contribuir para a aquisição de fenótipo similar ao M2, como a produção de prostaglandina E2 (PGE2), IL-6 (86) e CCL2 (87) pelas células tumorais e a secreção de IL-10 pelas células tumorais (88) e

linfócitos T reguladores (Tregs) (89); inclusive, os linfócitos T efetores que infiltram tumores da cérvix uterina expressam IL-4 (90) que, como já comentado, induz a diferenciação para perfil M2.

Além das diferenças discutidas acima, a polarização para perfil M1 ou M2 também acarreta características metabólicas distintas entre essas células, em relação à utilização de glicose, aminoácidos, lipídeos e ferro, e evidências sugerem que o metabolismo é um importante determinante do fenótipo funcional adquirido por macrófagos sob a influência de estímulos derivados do microambiente tecidual (91). Macrófagos classicamente ativados realizam predominantemente glicólise (92) e apresentam aumento do alto fluxo da via das pentoses-fosfato (PPP) e da síntese de ácidos graxos, além de possuírem ciclo de Krebs truncado (93), o que permite a estas células suportar microambientes hipóxicos e desencadear rápidas respostas citotóxicas (pois o aumento do fluxo da PPP gera mais NADPH, o qual é utilizado para a produção de superóxidos durante o estresse oxidativo para eliminar bactérias extracelulares (94-96) e para a produção de antioxidantes que auxiliam na proteção destas células após o estresse oxidativo (97)), sendo o tipo de metabolismo mais adequado para atingir a demanda destas células (91). Em contraste, a oxidação fosforilativa é mais prevalente em macrófagos alternativamente ativados, processo que é acompanhado da oxidação de ácidos graxos e da queda da glicólise e da via das pentoses fosfato (93), providenciando energia sustentada para o reparo e remodelamento tecidual (98).

Os estados de ativação M1 e M2 foram definidos *in vitro* e podem ser observados *in vivo* em condições fisiológicas e patológicas, como infecções por parasitas, alergias e muitos tipos de tumores. Porém, em algumas condições – em especial, em alguns cânceres – a população de macrófagos associados a tumores (TAMs) pode expressar um fenótipo único ou misto, que pode ser resultado de diversos sinais derivados do microambiente onde estas células se encontram, da coexistência de subpopulações celulares com diferentes fenótipos no mesmo tecido, e das mudanças dinâmicas durante a progressão da doença (revisado em (10, 78)). Além disso, estas células podem transitar entre um fenótipo e outro durante uma resposta imune ou patologia (99-101).

De fato, TAMs expressam genes característicos de ambos os estados M1 e M2 (99, 102). Estas células possuem a capacidade de rapidamente se adaptar ao microambiente tumoral e, sendo assim, podem assumir fenótipos e funções diferentes dependendo do estágio do tumor e da localização das células no mesmo, sendo estas diferenças sustentadas pelo remodelamento

do metabolismo energético destas células. Nos estágios iniciais da oncogênese, citocinas pró-inflamatórias recrutam e polarizam macrófagos para um perfil semelhante a M1, com alta taxa glicolítica e com atividade antitumoral. Entretanto, a persistência dos sinais inflamatórios podem levar a um estado de inflamação crônica que contribuirá para a instabilidade genômica das células tumorais, favorecendo a progressão tumoral, que pode resultar na habilidade nas células tumorais em repolarizar os macrófagos a um perfil semelhante ao M2, com funções pró-tumorais (103).

Sendo assim, apesar da plasticidade fenotípica dos TAMs, a polarização para um perfil imunossupressor tem se mostrado como uma característica em comum de muitos tumores, nos quais estas células possuem propriedades funcionais semelhantes a macrófagos M2 (104), como a alta expressão de citocinas anti-inflamatórias e fatores angiogênicos (102, 105, 106), a produção de fatores de crescimento (105, 107) e enzimas proteolíticas (108, 109), e a expressão de moléculas inibitórias, como PD-L1 e B7-H4 (110). Todos estes fatores contribuem para o crescimento, evasão do sistema imune, invasão e mutação das células tumorais, favorecendo o desenvolvimento e progressão do câncer (revisto por (40, 104)). Tem sido demonstrado na literatura que TAMs com perfil semelhante ao de macrófagos M2 utilizam preferencialmente a fosforilação oxidativa (111-113), especialmente em áreas hipóxicas do tumor, onde a diminuição da atividade glicolítica dos TAMs irá aumentar a disponibilidade de glicose para outros usos que contribuirão para a progressão tumoral. Por exemplo, as células endoteliais poderão utilizar da glicose, o que as permitirá entrarem em estado hiperativo, resultando na formação aberrante de vasos sanguíneos, contribuindo para a metástase (113). Além disso, a diminuição da utilização de glicose pelos TAMs disponibiliza mais glicose para as células tumorais, as quais são classicamente glicolíticas em regiões hipóxicas.

Entretanto, em experimentos com macrófagos derivados de medula óssea de murinos, diferenciados com extratos de câncer de mama, Liu e colaboradores mostraram que os TAMs eram altamente glicolíticos, apesar de apresentarem funções semelhantes a macrófagos M2 (114). Além disso, Arts e coautores também demonstraram que o lactato produzido por células de carcinoma da tireoide causa a transição da oxidação fosforilativa para a glicólise em TAMs, acompanhada de aumento da secreção de lactato, TNF e IL-6 (115). Juntos, estes experimentos demonstram que os macrófagos são capazes de contribuir para a progressão tumoral apesar da competição pela glicose (103). Sendo assim, com base nos estudos realizados até o momento, é possível concluir que as células tumorais estimulam os macrófagos a promover a progressão

tumoral enquanto também estimulam a adaptação metabólica dos mesmos ao microambiente no qual se encontram, para que eles possam melhor exercer suas funções pró-tumorais.

Em relação a tumores de cérvix uterina, estudos prévios do laboratório com modelo murino mostraram que a maioria dos macrófagos que infiltram tumores associados ao HPV de fato apresenta fenótipo semelhante a M2 e exerce função pró-tumoral ao inibir a ativação de linfócitos T anti-tumorais (116). Além disso, já foi demonstrado em pacientes com câncer avançado da cérvix uterina que a polarização dos TAMs para perfil M2 tem correlação com baixa resposta a quimioterapia e radioterapia, e diminuição da sobrevivência (117). Sabendo disso e considerando o aumento das concentrações séricas de lactato em pacientes com câncer do colo uterino, o laboratório buscou investigar se o lactato secretado por estas células teria parcela de responsabilidade sobre o fenótipo pró-tumoral de macrófagos infiltrantes destas lesões.

1.4 Lactato e seus efeitos sobre células imunes

O metabolismo glicolítico assumido por muitas células tumorais limita a disponibilidade de glicose para outras células do microambiente tumoral (118) e resulta em acumulação extracelular de lactato (119) que, como comentado anteriormente, é uma molécula produzida a partir de piruvato, por meio da enzima lactato desidrogenase (LDH) (120). O lactato é secretado, juntamente com prótons, para o meio extracelular por meio dos MCTs (transportadores de monocarboxilatos), prevenindo a acumulação tóxica deste metabólito e a acidificação do meio intracelular das células tumorais (121). Por muito tempo, esta substância foi considerada como “lixo” metabólico, até surgirem observações de que esta molécula carbônica age como sinalizadora (122, 123) e pode, inclusive, ser utilizada como fonte de carbono pelas células (39, 124, 125). De fato, diversos estudos demonstraram que lactato inibe as atividades antitumorais de células efetoras, como linfócitos T, células NK e macrófagos (3). Por exemplo, Husain e colaboradores mostraram que as células NK apresentam diminuição de citotoxicidade quando na presença de lactato (126) e outros estudos observaram que o ácido láctico suprime a ativação e proliferação de linfócitos T *in vitro* (127); além disso, a produção de ácido láctico, com conseqüente acidificação do meio, prejudica a expressão de IFN- γ por células T e NK que infiltram tumores (128). Quanto às células mielóides, Selleri e

colaboradores observaram que a presença de altas quantidades de lactato, durante a diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos, desvia o processo para a aquisição de macrófagos M2, em termos de morfologia, marcadores de superfície, propriedades migratórias e capacidade de apresentação de antígeno (129). De fato, Colegio *et al.* demonstraram que o lactato pode promover o fenótipo M2 através da estabilização de HIF-1 α (123).

A expressão de MCTs apresenta correlação positiva com o grau de lesões associadas à infecção por HPV, sugerindo que, quanto mais a lesão progride, mais as células produzem e exportam lactato (130). Com efeito, nosso laboratório previamente observou que as concentrações séricas de lactato são maiores em pacientes com câncer do colo uterino, comparado com indivíduos saudáveis (40). Com base nesses dados, nosso grupo levantou a hipótese de que o lactato poderia modular o fenótipo de macrófagos associados a tumores de cérvix uterina. Para isso, esferoides tumorais foram tratados durante 24 horas com oxamato (inibidor de LDH) e, após este período, o meio de cultivo foi trocado por meio sem oxamato, contendo monócitos obtidos a partir do sangue periférico de doadores saudáveis. A cocultura foi mantida durante seis dias, para permitir a diferenciação dos monócitos em macrófagos e, ao final desta ocasião, foi observado que a diminuição da concentração de lactato sobre estas células resultou em alteração fenotípica das mesmas, com redução em marcadores de fenótipo M2 e, mais importante, com aumento na capacidade de ativação de linfócitos T, gerando potencialmente, segundo o perfil de secreção de citocinas, menos células T reguladoras em relação a células efetoras Th1 (40).

Os efeitos imunossupressores do lactato podem ser exercidos por meio da sinalização gerada quando os receptores de lactato, como o receptor acoplado à proteína G 81 e 132 (GPR81 e GPR132), são ativados pelo aumento das concentrações extracelulares desta molécula (131). Por exemplo, já foi demonstrado que o GPR81 medeia os efeitos inibitórios do lactato extracelular sobre macrófagos murinos e PBMCs humanas *in vitro* estimulados com LPS, inibindo a ativação de NF κ B, diminuindo a produção de IL-1 β e a ativação de componentes do inflamassoma (132). Também já foi mostrado que a ativação de GPR132 por lactato promove a polarização de macrófagos para um perfil semelhante ao M2, e a deleção de GPR132 reduziu a quantidade de macrófagos com este perfil e impediu a metástase do câncer de mama para os pulmões, em modelo murino; em humanos, foi constatada a existência de correlação positiva entre a expressão de GPR132 e a presença de macrófagos M2, a ocorrência de metástase e o mau prognóstico em pacientes com câncer de mama (133). Além disso, o metabolismo

glicolítico das células tumorais, com consequente exporte de lactato, acidifica o meio extracelular, e o recente estudo de Bohn e colaboradores mostrou que a acidificação por si só, independente de lactato, também induz o fenótipo regulador de macrófagos, através da expressão do repressor transcricional ICER, que é induzido pela ativação de receptores acoplados à proteína G ativados pela acidificação (134).

Como mostrado no trabalho de Errea e colaboradores, apesar da possibilidade de sinalização imunossupressora pelos receptores acoplados à proteína G, a inibição exercida pelo lactato sobre macrófagos pode ser independente destes receptores – em específico, neste estudo, independente de GPR81 (135). De fato, o lactato pode também exercer efeitos imunossupressores sobre os macrófagos por meio de sua captação pelo transportadores de monocarboxilatos, exercendo efeitos diretos sobre o metabolismo e função destas células (131). Com efeito, nos estudos prévios do laboratório onde foi demonstrada a diminuição de marcadores de fenótipo M2 em consequência da diminuição da secreção de lactato pelas células tumorais tratadas com oxamato, resultados semelhantes foram obtidos ao se inibir a captação de lactato pelos monócitos, os tratando com ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHC, inibidor de MCT) por 15 minutos, antes de adicioná-los à cultura de esferoides tumorais (40). Estes resultados demonstram que o efeito imunossupressor do lactato sobre os macrófagos no cenário destes experimentos foi mediado pela captação desta molécula pelo MCT-1.

1.4.1 Transportadores de monocarboxilatos

Os transportadores de monocarboxilatos fazem parte de uma família de 14 carreadores, dos quais quatro (MCTs 1-4) demonstraram ser capazes de facilitar o transporte próton-dependente de monocarboxilatos (dentre eles, o lactato) através da membrana plasmática (119). Estes transportadores são capazes de realizar o transporte bidirecional de lactato, com a direção do transporte sendo determinada pelo pH, concentração intra e extracelular de lactato, e pela afinidade e níveis de outros substratos do MCT, como acetato e piruvato (136, 137). As principais diferenças entre as isoformas 1-4 do transportador tem relação com a afinidade dos mesmos por seus substratos e inibidores, a regulação de sua expressão, a distribuição tecidual e localização celular (119).

O MCT 1 é a isoforma mais predominante na maioria dos tecidos, sendo expresso em quase todos eles (138, 139), estando presente em células de diversos tipos de tumores (39, 119) e em macrófagos (140). Esta isoforma do transportador tem alta afinidade por lactato e é o principal exportador desta molécula quando os níveis intracelulares da mesma estão baixos. Já o MCT 4 tem menor afinidade por lactato e também é vastamente expresso, mas está principalmente presente em tecidos que dependem da glicólise, como leucócitos (51, 138), estando associados majoritariamente com o exporte de lactato (37).

O aumento da expressão destes transportadores em câncer é uma característica comum de tumores (revisto em (141)) e a proposta de que a expressão predominante do MCT 1 ou MCT4 tem relação com o metabolismo e a localização das células dentro do tumor tem ganho cada vez mais destaque. De fato, o estudo de Sonveaux e colaboradores demonstrou que células derivadas de câncer da cérvix uterina da linhagem SiHa, que expressam maior nível de MCT1 e baixos níveis de MCT4, apresentam metabolismo majoritariamente oxidativo e consomem significativamente mais lactato do que células de câncer colo retal da linhagem WiDr, que são altamente glicolíticas e expressam níveis maiores de MCT4 e menores de MCT1 (39). Com efeito, foi demonstrado que MCT4 é induzido em células hipóxicas através de HIF-1 α (142), enquanto células tumorais próximas a vasos sanguíneos expressam MCT-1. Em conjunto, estes resultados vão de encontro com a proposta da simbiose metabólica tumoral comentada previamente, que propõe que as células tumorais glicolíticas das regiões hipóxicas do tumor exportam, através do MCT4, o lactato que é captado pelas células da região oxigenada através de MCT1 e utilizado como fonte de carbono, disponibilizando a glicose para o uso pelas células hipóxicas (143).

Especificamente em tumores da cérvix uterina, foi observado que quanto maior o grau das lesões cervicais, maior a expressão desses transportadores; no cenário do carcinoma celular escamoso, foi observada maior expressão de MCT-4 do que MCT-1, apesar de ambos estarem mais expressos do que em suas lesões precursoras (130). Esse aumento de expressão dos transportadores abre uma possibilidade de tratamento que envolva a inibição de uma ou mais isoformas do MCT; porém, lembrando que os macrófagos são importantes componentes do microambiente tumoral, também é necessário levar em consideração os efeitos que este tipo de tratamento teriam nessas células, já que macrófagos glicolíticos (ativados por LPS, estímulo que leva a diferenciação para perfil M1) exportam lactato de seu meio intracelular por MCT4 (144).

A utilização de agentes moduladores do metabolismo no contexto tumoral, sozinhos ou em combinação com outras classes de agentes, tem mostrado eficácia no tratamento de neoplasias, como revisado no trabalho de Sborov e colaboradores (145). Pensando nos transportadores de monocarboxilatos, dois inibidores tem se destacado na literatura: o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHC) e o AZD 3965. O CHC inibe o MCT1 com aproximadamente dez vezes mais seletividade do que o MCT4 (146) enquanto o AZD 3965 é um inibidor seletivo de MCT1 e MCT2, tendo aproximadamente seis vezes mais seletividade pelo primeiro do que pelo segundo (147).

Em confluência com a literatura, nosso laboratório mostrou que intervenções metabólicas no microambiente tumoral são capazes de auxiliar no combate ao tumor, ao tratar células tumorais com oxamato ou macrófagos com CHC. Porém, na clínica, a administração desses tipos de tratamentos resultaria em ação dos mesmos sobre todas as células do microambiente tumoral, e não apenas em um subtipo celular específico. Sendo assim, este projeto pretende testar a hipótese de que o tratamento de células tumorais e macrófagos em conjunto com inibidores do MCT1 tem potencial como possível terapia, já que estes agentes seriam capazes de interferir com o metabolismo das células tumorais, possivelmente as prejudicando, enquanto diminuiriam o efeito imunossupressor do lactato através de MCT1 nos macrófagos (123) sem impedir que os mesmos realizem a glicólise, pois o MCT4 ainda seria capaz de exportar lactato.

2 OBJETIVOS

Este estudo objetiva estudar o efeito do tratamento de coculturas de células tumorais de linhagem cervical e monócitos com o inibidor do transportador de monocarboxilatos (MCT), ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHC). Para este fim, objetivos específicos foram conduzidos:

- Avaliação da presença de alterações de frequência e número absoluto de células tumorais e macrófagos nas culturas tratadas com CHC.
- Verificação de alterações de viabilidade das células após o tratamento com CHC.
- Estudo das alterações fenotípicas causadas nos macrófagos com o CHC.
- Investigação da cinética de ação do tratamento com CHC, sobre as células tumorais e macrófagos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Neste trabalho, avaliamos principalmente o efeito do tratamento sobre células tumorais e macrófagos provenientes de monócitos de doadores saudáveis. Este braço do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos (CEPSH) do Instituto de Ciências Biomédicas, parecer 1377/2018, recrutando doadoras voluntárias clinicamente saudáveis, com idade entre 25 e 50 anos, do corpo de alunas e professoras da Universidade de São Paulo (USP).

Nós também tivemos a oportunidade de iniciar um piloto com monócitos do sangue periférico de pacientes com câncer da cérvix uterina. Esta segunda coorte foi aprovada pelo Comitê de Ética do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, registro 1395/18, e pelo CEPSH, parecer 1438/2019, recrutando doadoras voluntárias saudáveis e pacientes com câncer do colo uterino do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), com indicação de procedimento cirúrgico. Ambos os grupos aceitaram mulheres com idade entre 18 e 70 anos.

Para ambas as coortes, foram considerados como critérios de exclusão gravidez, imunossupressão ou imunodeficiência de qualquer tipo, diabetes e caquexia. Todos os indivíduos envolvidos no estudo assinaram o formulário de consentimento informado antes da obtenção da amostra.

3.2 Enriquecimento de monócitos humanos

Para a obtenção de células de sangue periférico humano, foi realizada a punção venosa de membro superior das doadoras em tubos Vacuplast tratados com heparina de sódio (CRAL, Cotia, BR) utilizando equipamentos adequados para a coleta. Na sequência, o sangue diluído com tampão fosfato salino (PSB) 1X foi submetido a centrifugação com gradiente de densidade Ficoll-Paque Plus (GE, Healthcare, UK) para a separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). A população de monócitos foi enriquecida a partir das PBMCs por seleção

negativa, com a utilização do *Pan Monocyte Isolation Kit* (Milteny Biotec Inc, GE) ou *EasySep™ Human Monocyte Enrichment Kit without CD16 Depletion* (STEM CELL TECHNOLOGIES, CA), seguindo as instruções dos fabricantes.

A viabilidade média das preparações de PBMCs e células enriquecidas de monócitos foi de, respectivamente, $97,36\% \pm 1,2\%$ e $97,27\% \pm 1,5\%$. Amostras anteriores e posteriores a separação foram marcadas com anticorpo anti-CD11b (clone ICRF44) para avaliar a eficiência do protocolo. A frequência média de células CD11b positivas entre as PBMCs foi de $13,79\% \pm 5,6\%$. Em todos os experimentos foi possível observar enriquecimento da população de macrófagos após a separação, com pureza média de $65,66\% \pm 8,8\%$ e rendimento médio de 1,03 milhões de macrófagos a cada 10 milhões de PBMCs (desvio padrão de 369,217 mil) (**Figura 2**).

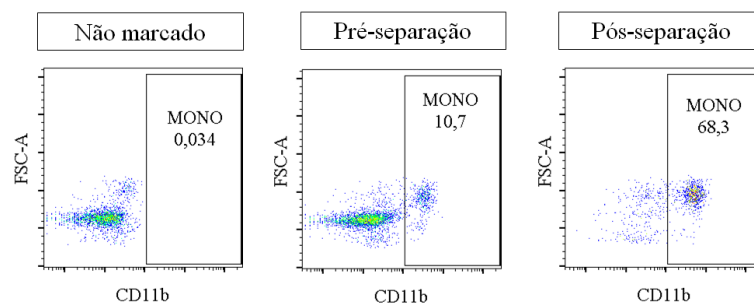


Figura 2. Porcentagem de células CD11b positivas.

Amostras anteriores e posteriores ao processo de separação de monócitos foram submetidas à citometria de fluxo. A amostra “Não marcado” não foi submetida a separação de monócitos e não foi marcada com o anticorpo CD11b. A amostra “Pré-separação” foi obtida da suspensão de PBMCs antes de serem submetidas a separação de monócitos, enquanto a amostra “Pós-separação” foi obtida da suspensão de células após a separação. Ambas as amostras “Pré-separação” e “Pós-separação” foram marcadas com o anticorpo CD11b. MONO = monócitos CD11b+.

3.3 Linhagens tumorais

Na maioria dos experimentos utilizamos a linhagem de célula tumoral cervical SW756, positiva para HPV 18, pois a mesma foi a melhor estudada no trabalho prévio do laboratório, a partir do qual este projeto foi formulado. No piloto com as células provenientes de pacientes com câncer cervical, utilizamos a linhagem HeLa, também positiva para HPV 18. As linhagens tumorais foram obtidas da ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, MA) entre 2013 e 2014. As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Thermo

Scientific) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 5 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina e 2 mM de glutamina (R10) a 37°C, em atmosfera com 5% CO_2 .

3.4 Geração dos esferoides tumorais e cocultura com monócitos (condição não tratada)

As células cultivadas em frascos foram recolhidas por tratamento com tripsina e, em seguida, semeadas em placas de 96 poços com fundo em “U” sobre colchão de 50 μL de 1% de agarose em PBS, onde ficaram durante quatro dias para permitir a formação e crescimento do esferoide tumoral. No quarto dia, $\frac{3}{4}$ do meio de cultivo foi recolhido e substituído por meio fresco contendo monócitos recém obtidos a partir do sangue periférico de doadoras (sessenta e cinco mil células). A cocultura de esferoides e monócitos foi mantida em incubação por seis dias, permitindo a diferenciação de macrófagos (40), para ao final do período, ser avaliada em relação a diversos parâmetros (**Figura 3**); este protocolo já é bem estabelecido no laboratório. Além da análise ao final de dez dias de experimento, nós também realizamos experimentos onde a coleta das amostras foi feita no sétimo dia para compreender a cinética do tratamento, como melhor explicado à frente.

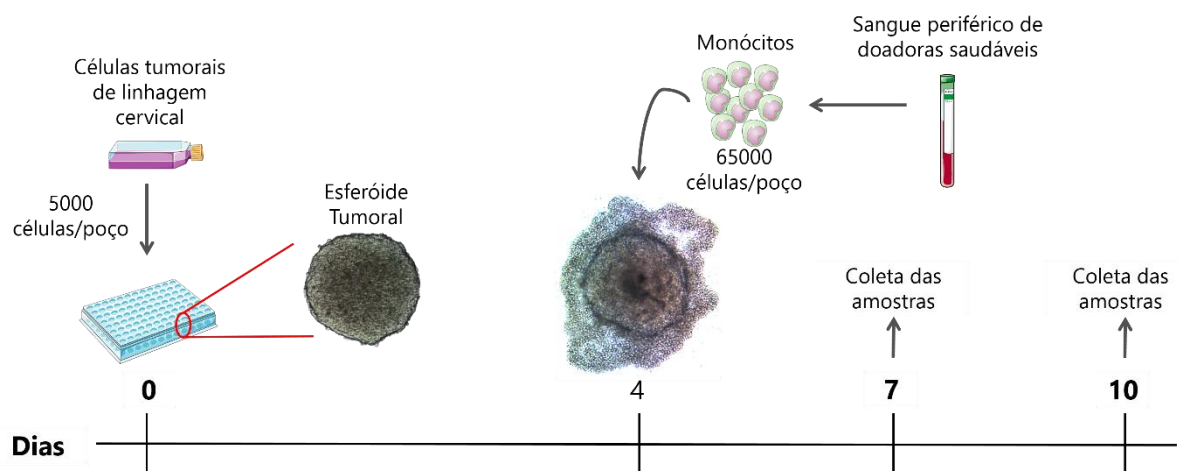


Figura 3. Cocultura de células tumorais com monócitos.

Esquema ilustrativo do protocolo de formação da cocultura não tratada de esferoides tumorais com monócitos, em relação à escala de tempo (dias). No primeiro dia foram semeadas sobre o “colchão de agarose” cinco mil células tumorais por poço na placa de 96 poços com fundo em “U”. As células foram incubadas por quatro dias para permitir a formação do esferoide. Após este período, sessenta e cinco mil monócitos obtidos de doadoras saudáveis foram adicionados à cultura e incubados nesta condição durante mais três (dia 7) ou seis (dia 10) dias. Ao final do período de sete ou dez dias, o conteúdo dos

poços foi recolhido para ser submetido às devidas análises. Os esferoides presentes na imagem foram formados com as células da linhagem SW756.

A utilização de cultura tridimensional apresenta diversas vantagens em relação com a cultura em monocamada. No caso específico deste estudo, a utilização deste modelo permite melhor mimetização da estrutura de um tumor *in vivo*, se aproximando mais da realidade das interações célula-célula e mantendo características importantes, como a deposição de matriz extracelular. Além disso, a cultura tridimensional utilizando esferoides tumorais possibilita a realização de coculturas com outros tipos celulares que exercem grande influência na tumorigênese (como os macrófagos), permitindo melhor visualização de interações entre diferentes tipos de células e, até mesmo, diferenças na infiltração de células no esferoide (148). A **Figura 4** apresenta imagens representativas da cultura tridimensional de células tumorais e macrófagos. As células tumorais são capazes de formar uma estrutura tridimensional quando semeadas acima da agarose devido a sua habilidade de crescimento independente de ancoragem, uma capacidade adquirida ao longo de sua transformação tumoral (149).

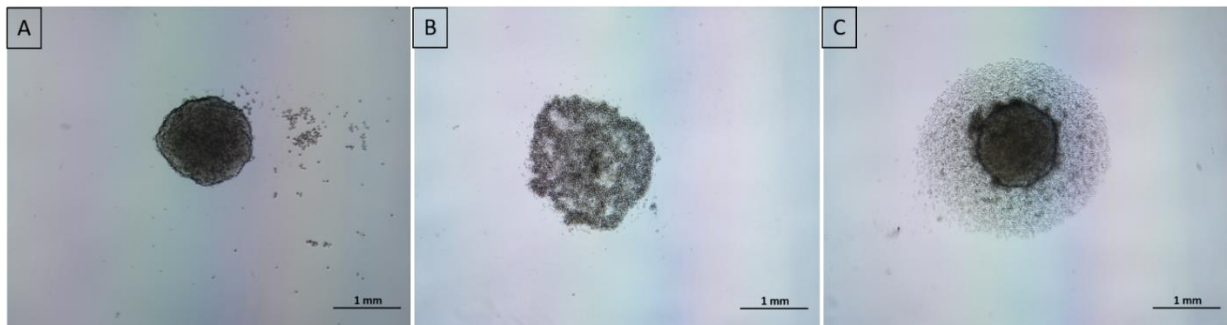


Figura 4. Fotografias de esferoides e macrófagos por microscopia de luz invertida.

Fotografias realizadas no aumento de 4X em microscópio de luz invertido. As imagens são representativas da monocultura de células tumorais (A), monocultura de macrófagos (B) e cocultura de células tumorais e macrófagos (C) que foram semeadas sobre 50 μ L de 1% agarose, na placa de 96 poços com fundo em U, permitindo a formação da cultura tridimensional. As imagens foram tiradas no décimo dia dos experimentos. As células tumorais mostradas nas imagens são da linhagem SW756.

3.5 Tratamento das culturas

Neste projeto objetivamos avaliar a ação dos fármacos de estudo – ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHC) e AZD 3965 - sobre células tumorais e macrófagos simultaneamente,

mantendo os tratamentos nas culturas até o final do experimento. Desta forma, os fármacos foram adicionados à cultura no quarto dia de experimento e após isso, não houve readministração dos mesmos ou troca de meio cultura (**Figura 5**). Nós avaliamos os efeitos do CHC após seis dias de sua adição (dia 10) na cultura. Como melhor detalhado a diante, nós também realizamos experimentos observando os efeitos do CHC após três (dia 7) e seis (dia 10) dias da sua adição na cultura, e comparamos os resultados do CHC com o AZD 3965, seis dias após a adição dos inibidores à cultura.

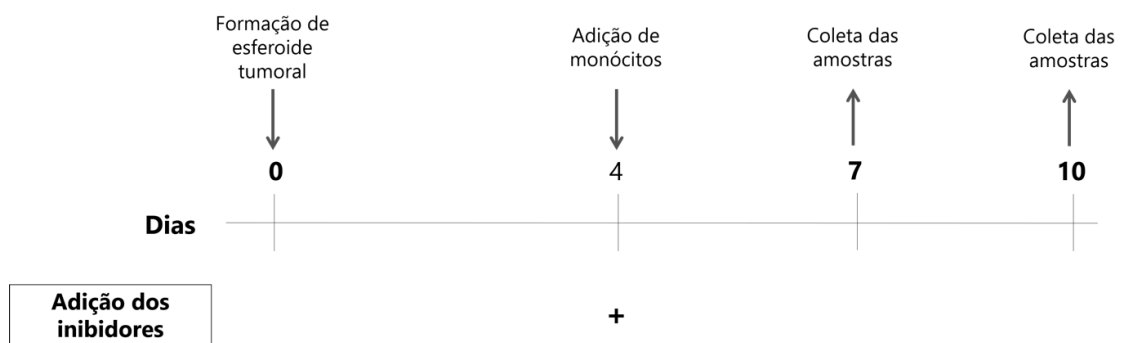


Figura 5. Linha do tempo ilustrativa da estratégia de tratamento com os inibidores.

+ significa adição do fármaco na cultura

Os efeitos dos tratamentos foram observados sobre coculturas de células tumorais e macrófagos, além de monoculturas de macrófagos e monoculturas de células tumorais. Ambos os inibidores utilizados (CHC e AZD3965) necessitam de DMSO para que sejam solubilizados em meio de cultura. Desta forma, além das condições sem tratamento e com tratamento, nós também analisamos células tratadas com concentração de DMSO equivalente ou superior a presente nos poços com tratamento, para garantir que os efeitos observados com o tratamento são consequência do inibidor, e não do solvente. O piloto com as amostras das pacientes com câncer do colo uterino são uma exceção, não contendo o grupo controle de solvente (DMSO) e as monoculturas, por limitação de disponibilidade de amostra.

3.5.1 Curva dose-resposta dos inibidores

Para a utilização dos inibidores, foram realizados experimentos testando diferentes concentrações das substâncias, utilizando como valores de referência dados da literatura (40, 150-153), e observando os resultados após seis dias do tratamento. Sendo assim, para o CHC foram testadas as concentrações de 2, 4 e 8 mM, enquanto para o AZD3965 foram avaliadas as doses de 5, 25 e 50 nM. O racional para a escolha da concentração que seria utilizada para o restante dos experimentos foi a busca de uma dose que não fosse tóxica para os monócitos/macrófagos, enquanto ainda apresentasse potencial antitumoral. Para isso, monoculturas e coculturas de células tumorais da linhagem SW756 e macrófagos foram tratadas com diferentes concentrações dos inibidores no quarto dia de experimento, e avaliadas seis dias após o tratamento em relação a tamanho e granulidade das células, com dados obtidos por citometria de fluxo. As doses estabelecidas nestes experimentos foram utilizadas no restante do trabalho.

3.6 Fenotipagem e avaliação de viabilidade, seis dias após o tratamento com CHC

Primeiramente, nós avaliamos os efeitos do tratamento com CHC após seis dias de sua adição nas culturas com células tumorais da linhagem SW756 e macrófagos, buscando investigar diferenças na frequência, viabilidade e fenótipo das células, por citometria de fluxo. Para obter a suspensão de células únicas necessárias para a execução das citometrias, as células foram digeridas com 1 mg/mL de Colagenase tipos 1 e 4 (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ) por vinte a trinta minutos, 37°C, sob agitação. A reação foi interrompida pela adição da solução gelada de MTH (solução tampão salina Hanks' 1x e 15 mM de HEPES em pH 7.4, 5% de SFB e 0.5 U/mL de DNase I) (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA). A viabilidade das células no momento de execução do protocolo foi avaliada por meio de contagem na câmara de Neubauer de células coradas com *Trypan Blue*. Antes da incubação com os anticorpos específicos, os receptores Fc das células foram bloqueados com 5 µg/mL de Fc block (BD Biosciences, San Jose, CA) por dez minutos. Os anticorpos utilizados para a marcação foram: CD14 APC (clone M5E2), CD45 V500 ou Alexa 700 (clone H130), CD86 PE-Cy7 (clone 2331 (FUN-1)), HLA-DR APC-Cy7 (clone L243). As células foram incubadas com os anticorpos durante vinte minutos e em seguida foram lavadas com 500 µL de MTH. Para a análise da viabilidade celular por citometria de fluxo foi utilizado 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (Thermo Fisher Scientific, MA, US), de acordo com o

protocolo de Gordon e colaboradores (154), adaptando a quantidade de DAPI utilizada para a melhor concentração em nossas culturas. As células foram suspensas em 200 uL de tampão contendo 0,05 µg/mL de DAPI logo antes de serem adquiridas no citômetro BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, San Jose, CA). Nos resultados são mostrados os dados de viabilidade gerados com a utilização do DAPI, e não do *Trypan Blue*, pois os valores obtidos com o DAPI se aproximam mais da realidade, já que consideram maior parte das amostras e independem de análise humana, que pode conferir variabilidade adicional aos números.

3.7 Avaliação da cinética de apoptose e necrose e comparação do CHC com o AZD 3965

Para compreender os processos de morte celular envolvidos no tratamento com CHC, as monoculturas e coculturas de esferoides tumorais da linhagem SW756 foram gerados novamente, seguindo o protocolo descrito no item 3.4. Estes experimentos envolveram dois objetivos: a compreensão da cinética existente por trás dos efeitos do CHC e a comparação dos efeitos do CHC com o AZD 3965, após seis dias da adição dos inibidores à cultura. Desta forma, foi realizada a marcação das células tumorais e macrófagos com Anexina V e 7AAD para análise por citometria de fluxo, após três (dia 7) e seis (dia 10) dias da adição do CHC à cultura (**Figura 6**). Além disso, o tratamento com o AZD 3965 também foi incluído na análise de 10 dias, para comparar os efeitos dos inibidores após seis dias de tratamento, em relação a frequência de células.

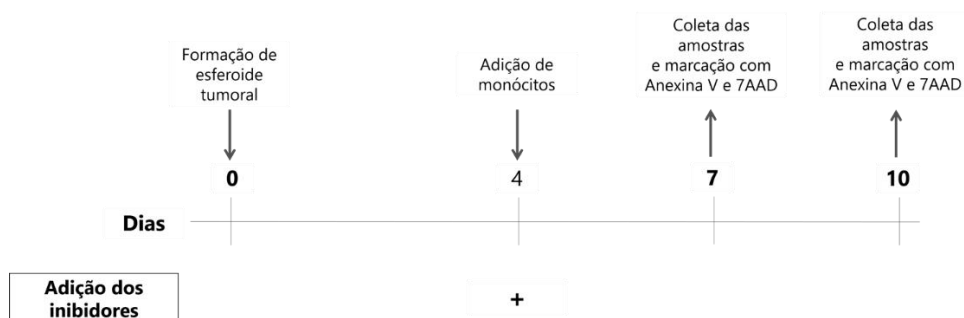


Figura 6. Linha do tempo ilustrativa dos experimentos de cinética com Anexina V e 7AAD.
+ significa adição do fármaco na cultura

O protocolo de digestão e marcação das células provenientes das culturas tridimensionais foi o mesmo descrito no item anterior. Os anticorpos utilizados para fenotipagem das células nestes experimentos foram CD14 APC (clone M5E2) e CD45 V500 (clone H130). Ao final do período de incubação, as células foram lavadas e suspendidas em 100 μ L de tampão contendo 1 μ L de Anexina V (BD Biosciences, San Jose, CA). As células foram incubadas nesta solução durante 15 minutos, em temperatura ambiente, no escuro. Após este período, foram adicionados mais 100 μ L de tampão e 10 μ L de 7AAD (BD Biosciences, San Jose, CA) por tubo, e as células foram adquiridas no citômetro BD FACSCantoTM II (BD Biosciences, San Jose, CA).

3.8 Estratégia de *gates* por citometria de fluxo

Para a interpretação dos dados obtidos por citometria de fluxo, os arquivos das aquisições foram analisados no software FlowJo (Becton, Dickinson & Company, EUA). Cada bloco de experimentos (I. Fenotipagem e avaliação de viabilidade, seis dias após o tratamento com CHC e II. Avaliação da cinética de apoptose e necrose e comparação do CHC com o AZD 3965) foi analisado seguindo uma mesma estratégia de *gates* para todos os experimentos que o compõem.

3.8.1 Bloco I: Fenotipagem e avaliação de viabilidade, seis dias após o tratamento com CHC

A estratégia de *gates* utilizada em todos os experimentos é representada nas **figuras 7, 8 e 9** para a monocultura de macrófagos, monocultura tumoral e cocultura de células tumorais e macrófagos, respectivamente. Em todas as condições, inicialmente foi realizada a exclusão de *debris* celulares através dos *dot-plots* de tamanho por granulosidade (FSC x SSC) e, em seguida, foram excluídos os eventos correspondentes a *doublets* (eventos que possuem dobro de área, sem possuir o dobro de altura, correspondendo a células unidas umas às outras) através dos *dot-plots* de área contra altura (FSC-A x FSC-H). Na sequência, duas diferentes análises foram realizadas: a análise da frequência de populações de células, incluindo células vivas e mortas, seguida da avaliação da viabilidade de cada uma dessas populações; e a análise da expressão de moléculas relacionadas a apresentação de antígeno (HLA-DR e CD86) pelos macrófagos da monocultura e da cocultura, após a exclusão de todas as células mortas.

Inicialmente, a determinação das populações presentes nas amostras seguiu o critério:

- Células que expressam CD14 e CD45 foram consideradas macrófagos;
- Células que não expressam CD14 nem CD45 foram consideradas células tumorais;

Porém foi possível observar em todos os experimentos que, com o tratamento das monoculturas e coculturas com o CHC, ocorreu o aparecimento expressivo de uma nova população negativa para CD14 e positiva para CD45, a qual foi chamada de POP CD45+/CD14-. Na monocultura de macrófagos foi possível inferir que esta população corresponde, majoritariamente, a macrófagos vivos (**Figura 7E**) que perderam a expressão de CD14, porém, ainda expressam HLA-DR (**Figura 7J**). Já na monocultura tumoral, esta população se mostrou equivalente a células tumorais mortas que passaram a apresentar autofluorescência para o canal AmCyam (correspondente a fluorescência do marcador para CD45) (**Figura 8D**), mas não para o canal de APC-Cy7, continuando a serem negativas para HLA-DR (**Figura 8F**). Com base nestas informações, foi possível delinear a estratégia para identificar macrófagos e células tumorais dentro da POP CD45+/CD14- nas coculturas (**Figura 9**) e a determinação final das populações nas amostras seguiu o seguinte critério e nomenclatura, que será utilizada durante todo o trabalho:

- Células que expressam CD14 e CD45 foram consideradas macrófagos e correspondem a subpopulação denominada “MAC CD14+”;
- Células que não expressam CD14 e expressam CD45, estão vivas (ou seja, são DAPI negativas) e expressam HLA-DR também foram consideradas macrófagos, sendo denominadas como a subpopulação “MAC CD14-“;
- Células que não expressam CD14 e CD45 foram consideradas células tumorais, sendo denominadas como a subpopulação “TUMOR CD45-“;
- Células que não expressam CD14 e são autofluorescentes para AmCyam, estão mortas (ou seja, são DAPI positivas) e não expressam HLA-DR também foram consideradas células tumorais, e esta subpopulação recebeu o nome de “TUMOR autofluorescente”;

Desta forma, a frequência final de macrófagos foi dada pela soma dos macrófagos que expressam CD14 com os macrófagos que não expressam essa molécula (MAC CD14+ e MAC CD14-) e a frequência final de células tumorais foi dada pela soma das células tumorais que

não expressam CD14 e CD45 com as células tumorais mortas e auto fluorescentes para AmCyan (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) (Figura 10).

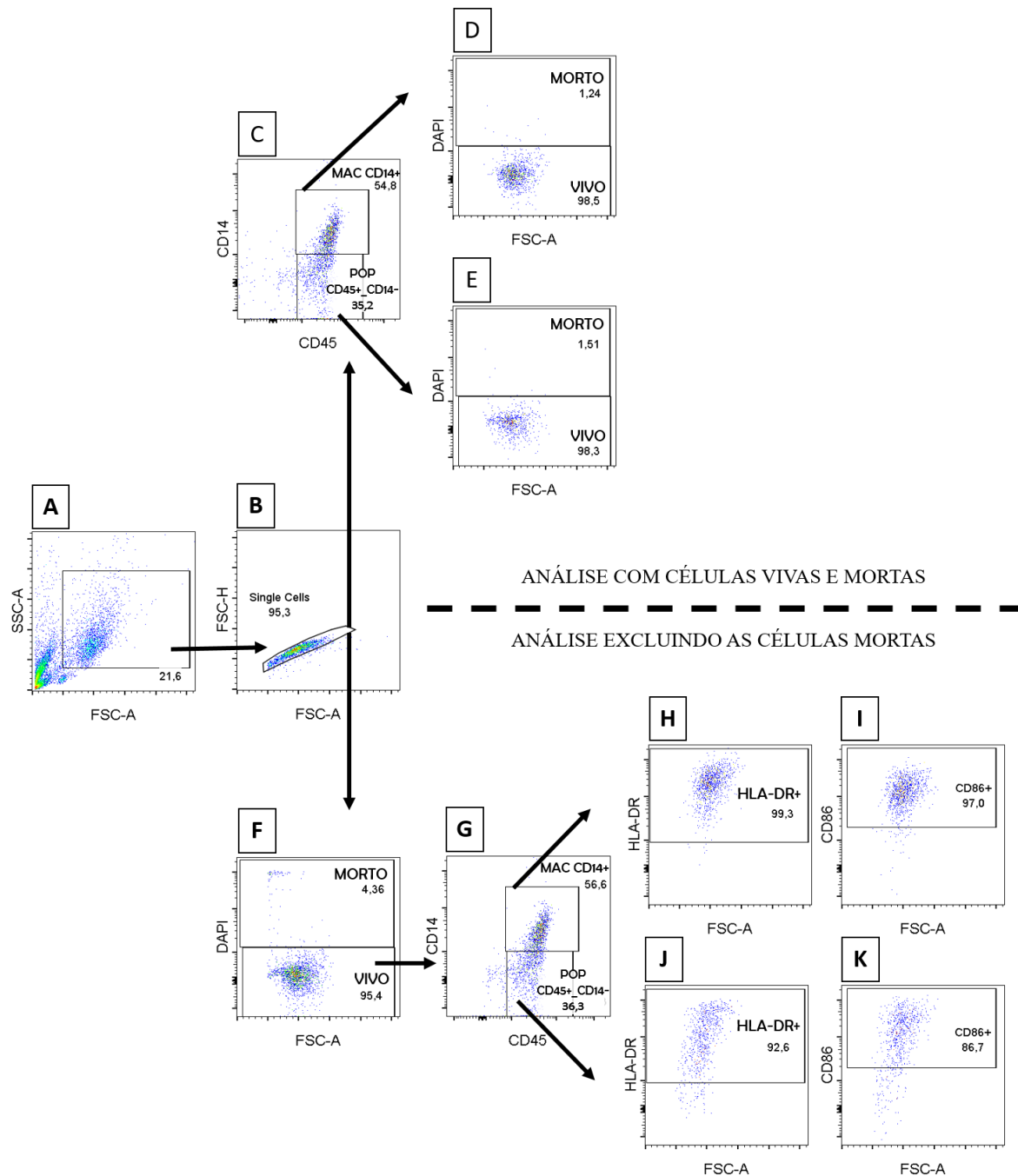


Figura 7. Estratégia de gates da monocultura de macrófagos, referente aos experimentos do bloco I - Fenotipagem e avaliação de viabilidade, seis dias após o tratamento com CHC.

Dot-plots representativas das citometrias de fluxo realizadas com as monoculturas de macrófagos, ilustrando a estratégia de gates utilizada para todas as monoculturas de macrófagos dos experimentos do bloco I. Primeiramente, foram excluídos da análise *debris* celulares (A) e *doublets* (B). As células únicas (*single cells*) foram então analisadas de duas formas: acima da linha pontilhada, é ilustrada a análise com células vivas e mortas, onde foi avaliada a frequência de populações na cultura (C) com posterior checagem da viabilidade de cada população (D e E); abaixo da linha pontilhada, é ilustrada a análise excluindo as células mortas (F) onde, após a delimitação das populações de células vivas (G),

foi analisada a expressão e frequência de marcadores de apresentação de antígeno (H e J: HLA-DR; I e K: CD86) em cada uma das populações (H e I: MAC CD14+; J e K: POP CD45+/CD14-, que na monocultura corresponde a MAC CD14-).

MAC CD14+ = macrófagos CD14+; POP CD45+_CD14- = população que não expressa CD14 e expressa CD45 (na monocultura de macrófagos, corresponde a população MAC CD14-).

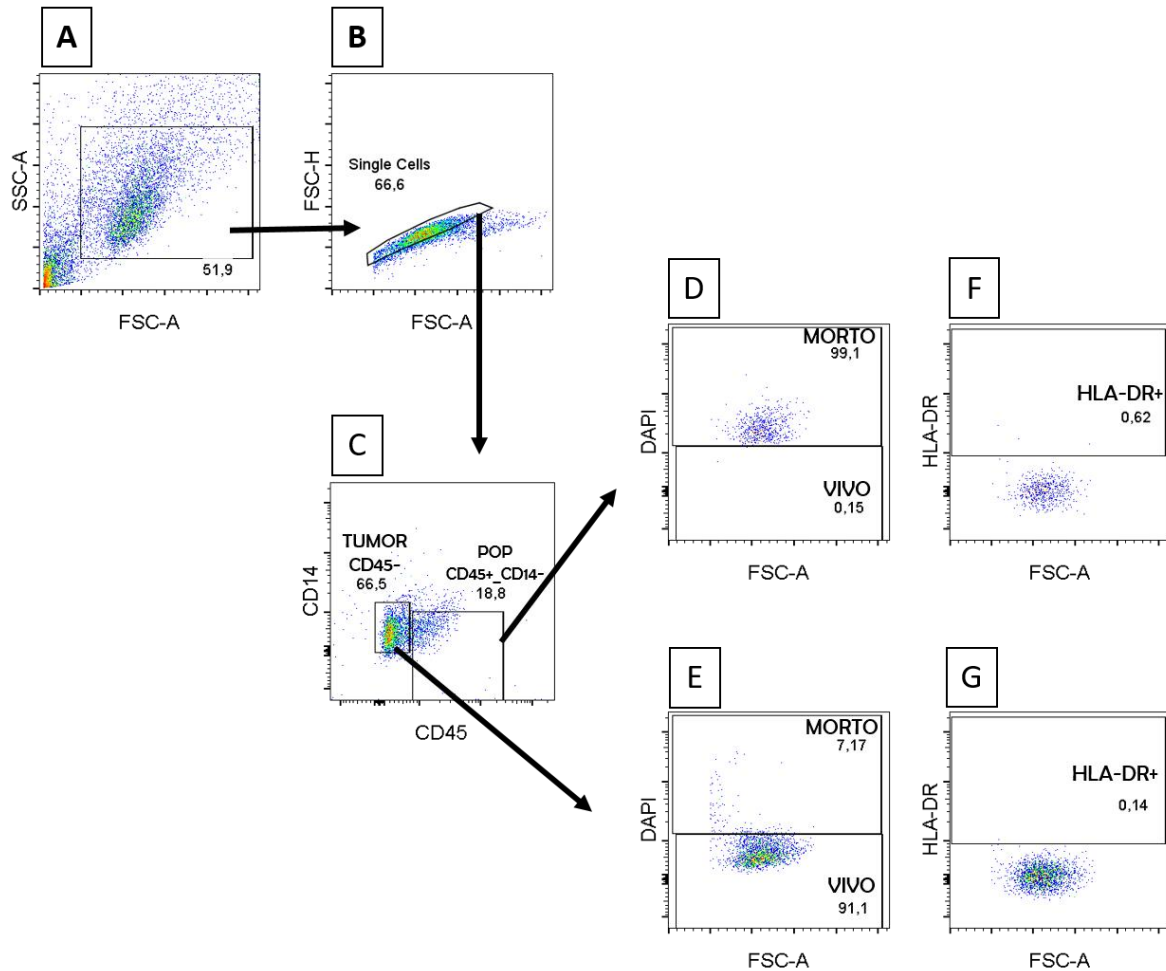


Figura 8. Estratégia de *gates* da monocultura de células tumorais dos experimentos do bloco I - Fenotipagem e avaliação de viabilidade, seis dias após o tratamento com CHC.

Dot-plots representativos das citometrias de fluxo realizadas com as monoculturas tumorais, ilustrando a estratégia de *gates* utilizada para todas as monoculturas de células tumorais dos experimentos do bloco I. Primeiramente, foram excluídos da análise *debris* celulares (A) e *doublets* (B). As células únicas (*single cells*) foram então avaliadas quanto a frequência de populações na cultura (C) com posterior checagem da viabilidade de cada população – POP CD45+/CD14- (D) e TUMOR CD45- (E) - e a existência de autofluorescência nessas células para APC-Cy7 (F e G). Foi possível observar que a população autofluorescente para AmCyam presente em C corresponde a células tumorais marcadas com DAPI e, portanto, são células mortas (D). Ambas as células tumorais mortas e vivas não apresentam autofluorescência para APC-Cy7, localizando-se no *gate* de células HLA-DR-.

TUMOR CD45- = células tumorais CD14-/CD45-; POP CD45+_CD14- = população que não expressa CD14 e tem autofluorescência para AmCyam (na monocultura de células tumorais, corresponde a população TUMOR autofluorescente).

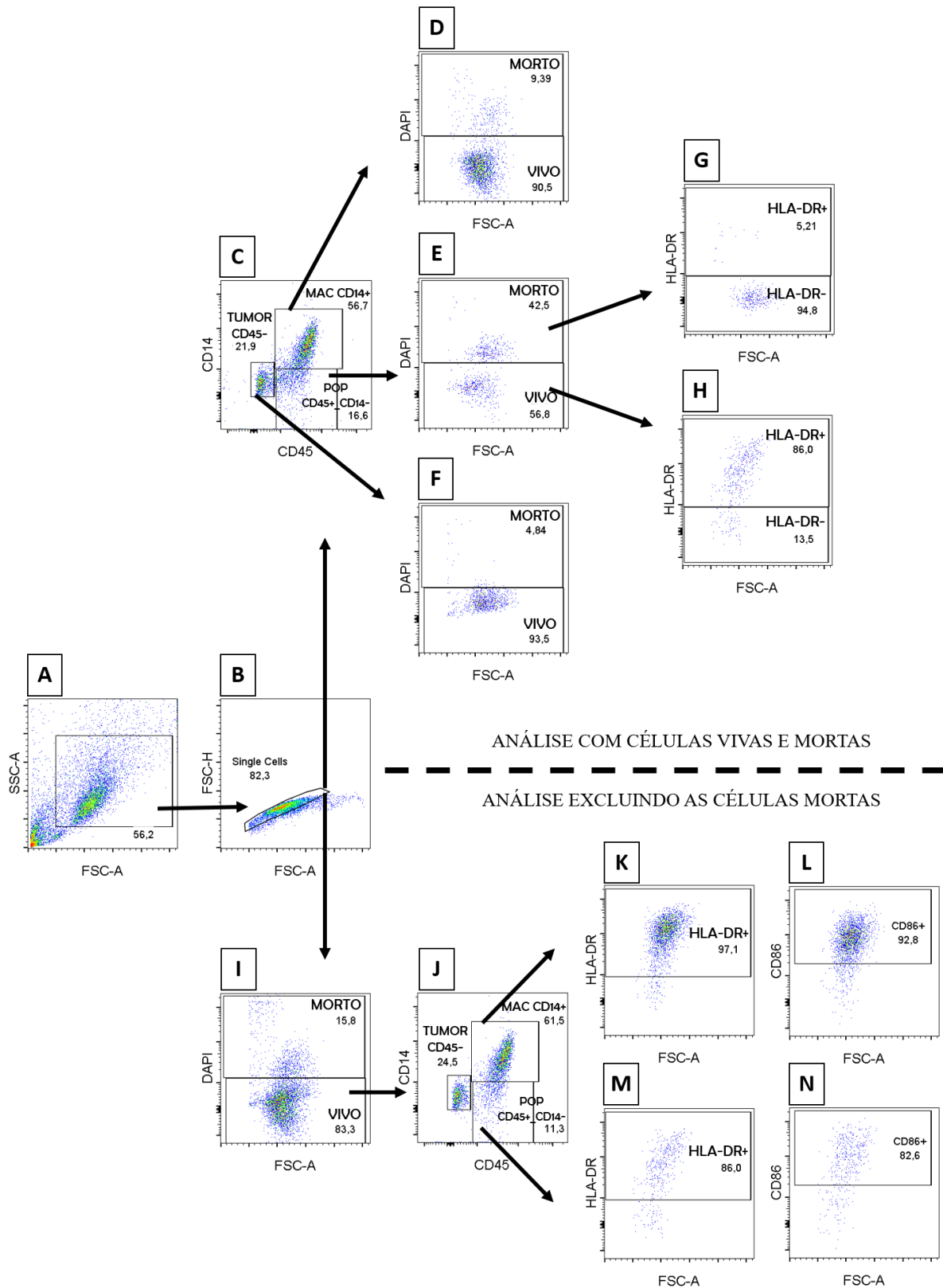


Figura 9. Estratégia de *gates* das células da cocultura dos experimentos do bloco I - Fenotipagem e avaliação de viabilidade, seis dias após o tratamento com CHC.

Dot-plots representativos das citometrias de fluxo realizadas com as coculturas de células tumorais e macrófagos, ilustrando a estratégia de *gates* utilizada para todas as coculturas dos experimentos do bloco I. Primeiramente, foram excluídos da análise *debris* celulares (A) e *doublets* (B). As células únicas

(single cells) foram então analisadas de duas formas: acima da linha pontilhada, é ilustrada a análise com células vivas e mortas, onde foi avaliada a frequência de populações na cultura (C) com posterior checagem da viabilidade de cada população (D, E e F), além da avaliação da frequência de macrófagos vivos expressando HLA-DR (MAC CD14-) e células tumorais mortas autofluorescentes para AmCyam que não expressam HLA-DR (TUMOR CD45-) na população POP CD45+/CD14- (G e H); abaixo da linha pontilhada, é ilustrada a análise excluindo as células mortas (I) onde, após a delimitação das populações de células vivas (J), foi avaliada a expressão e frequência de marcadores de apresentação de antígeno (K e M: HLA-DR; L e N: CD86) em cada uma das populações (K e L: MAC CD14+; M e N: POP CD45+/CD14- que, sem as células mortas, corresponde a MAC CD14-).
 MAC CD14+ = macrófagos CD14+; TUMOR CD45- = células tumorais CD14-/CD45-; POP CD45+_CD14- = população que não expressa CD14 e tem autofluorescência para AmCyam, composta da população de MAC CD14- e TUMOR autofluorescente.

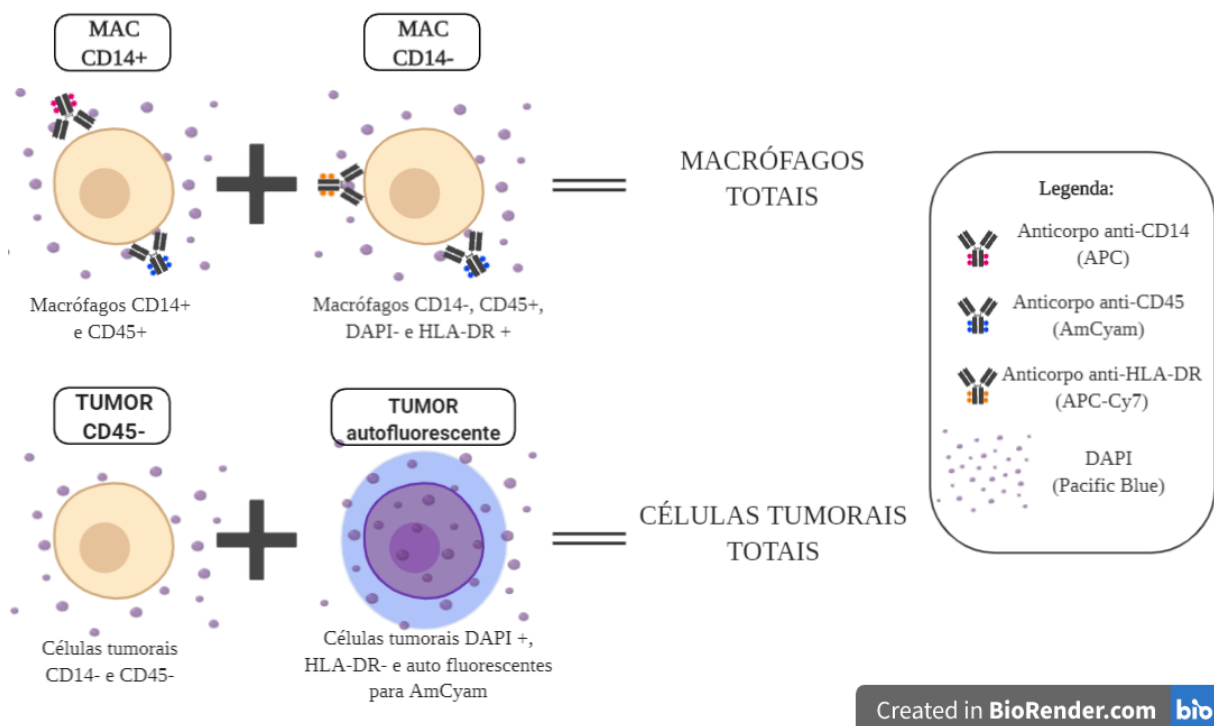


Figura 10. Esquema ilustrativo do delineamento de populações nas culturas.

A figura resume os critérios adotados para determinar a população total de macrófagos e de células tumorais nas culturas, após a delimitação dos *gates* nas análises. Como exemplificado na linha superior, foram consideradas como a população total de macrófagos as células que expressam CD14 e CD45, juntamente das células que não expressam CD14 e expressam CD45, estão vivas (ou seja, são negativas para DAPI) e expressam HLA-DR (macrófagos totais = MAC CD14+ e MAC CD14-). Por outro lado, foram consideradas como a população total de células tumorais as células que não expressam CD14 e CD45, juntamente das células que apresentaram fluorescência no canal AmCyam e estavam mortas (ou seja, são positivas para DAPI) e não expressam HLA-DR (células tumorais totais = TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente). Figura criada com Biorender.
 (MAC = macrófagos; TUMOR = células tumorais)

3.8.2 Bloco II: Avaliação da cinética de apoptose e necrose e comparação do CHC com o AZD 3965

A estratégia de *gates* utilizada em todos os experimentos, nas monoculturas e coculturas, é representada na **Figura 11**. Semelhante ao bloco I, inicialmente foi realizada a exclusão de *debris* celulares através dos *dot-plots* de tamanho por granulosidade (FSC x SSC) e, em seguida, foram excluídos os eventos correspondentes a *doublets* através dos *dot-plots* de área contra altura (FSC-A x FSC-H). Na sequência, foi avaliada a frequência de populações de células, com posterior análise da marcação com Anexina V e 7AAD na população de macrófagos que expressam CD14 e CD45 (MAC CD14+) e na população de células tumorais negativas para CD14 e CD45 (TUMOR CD45-). A marcação por Anexina e 7AAD não foi analisada na população POP CD45+/CD14- (que corresponde a MAC CD14- e TUMOR autofluorescente) na cocultura pois nestes experimentos não foi possível diferenciar com clareza a população de macrófagos e células tumorais neste grupo devido à ausência da utilização do anticorpo anti-HLA-DR nestes experimentos. Já nas monoculturas, a marcação por estes marcadores foi avaliada, já que as células podem ser consideradas com certeza células tumorais ou macrófagos por se tratar da cultura de um só tipo celular.

Células marcadas com Anexina V e não marcadas com 7AAD foram consideradas células em apoptose inicial (que correspondem as células no quadrante Q1), enquanto células marcadas com Anexina V e 7AAD foram consideradas como células em apoptose tardia (ou seja, células que entraram em apoptose e, por não terem sido eliminadas como o são em condições *in vivo*, sofreram perda da integridade de membrana) ou células necróticas (presentes no quadrante Q2); por fim, células não marcadas com Anexina V e 7AAD foram consideradas células vivas (as quais se localizam no quadrante Q4). Os eventos que não apresentaram marcação por Anexina V mas apresentaram marcação por 7AAD (presentes no quadrante Q3) não foram analisados, pois foram considerados como artefatos de experimento, correspondendo a aproximadamente $3,84 \pm 3,16$ por cento da população de células únicas. Esta estratégia de análise foi feita de acordo com dados da literatura (155-157). Para melhor compreensão, a seguinte nomenclatura foi adotada para a apresentação dos resultados referentes a estes experimentos (**Figura 11E**):

- Células do quadrante Q1, que correspondem a células Anexina V+/7AAD-, foram chamadas de “células em apoptose”;
- Células do quadrante Q2, que correspondem a células Anexina V+/7AAD+, foram chamadas de “células mortas”

- Células do quadrante Q4, que correspondem a células Anexina V-/7AAD-, foram chamadas de “células vivas”.

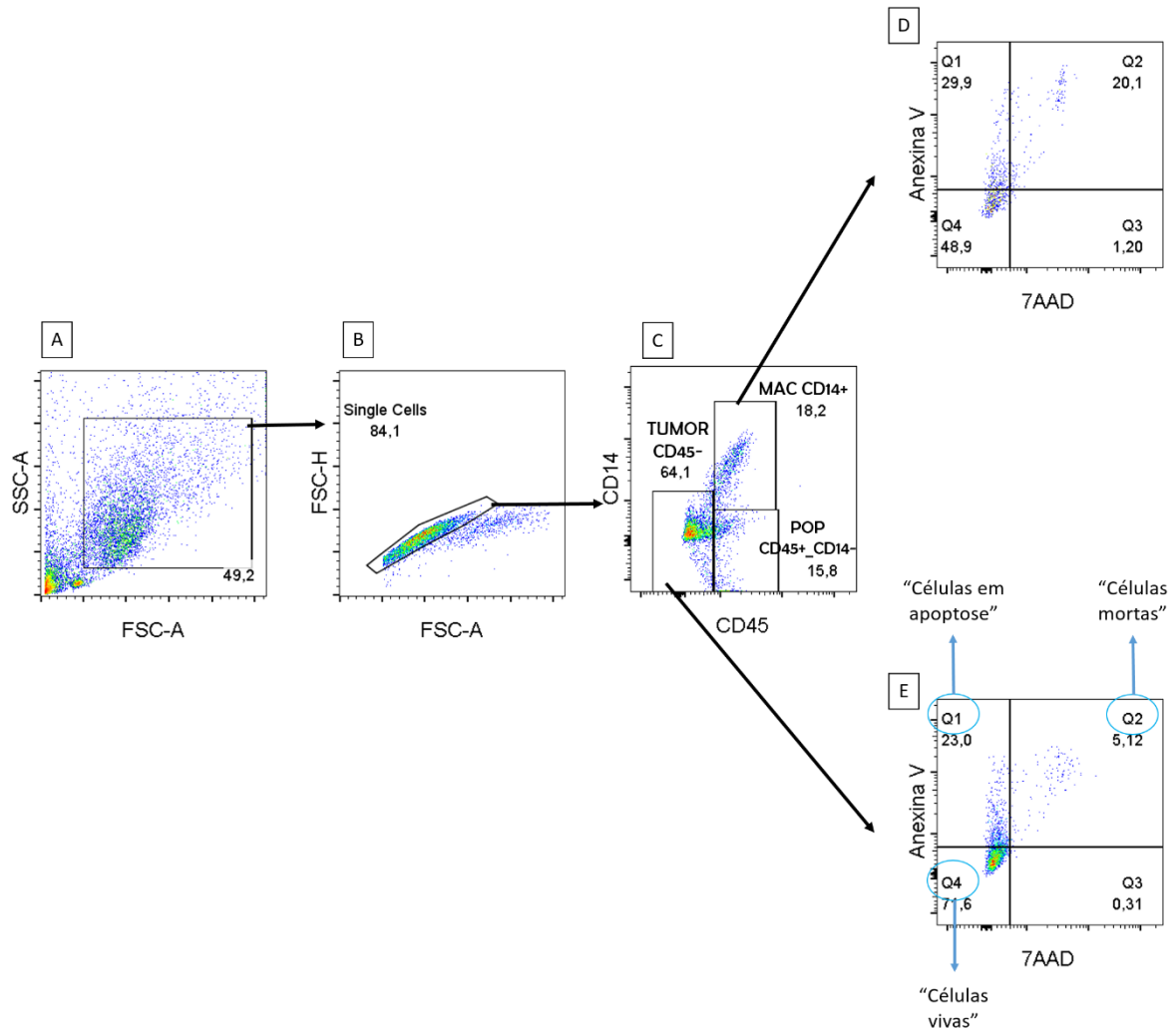


Figura 11. Estratégia de *gates* das células dos experimentos do bloco II - Avaliação da cinética de apoptose e necrose e comparação do CHC com o AZD 3965.

Dot-plots representativos das citometrias de fluxo realizadas com as monoculturas e coculturas de células tumorais e macrófagos, ilustrando a estratégia de *gates* utilizada para todas as amostras dos experimentos do bloco II (a figura corresponde a representação de uma cocultura). Primeiramente, foram excluídos da análise *debris* celulares (A) e *doublets* (B). As células únicas (*single cells*) foram então analisadas quanto a frequência de populações (C) e, na sequência, a marcação de Anexina V e 7AAD foi avaliada em cada uma delas (D: MAC CD14+; E: TUMOR CD45-). Células marcadas com Anexina V e não marcadas com 7AAD foram consideradas células em apoptose inicial e correspondem ao quadrante Q1; células marcadas com Anexina V e 7AAD foram consideradas células em apoptose tardia ou necrose e correspondem ao quadrante Q2; células marcadas apenas com 7AAD são artefatos experimentais, e se localizam no quadrante Q3; e, por fim, células vivas não se ligam com a Anexina V e não se marcam com 7AAD, correspondendo ao quadrante Q4. Nas monoculturas, a marcação por Anexina V e 7AAD foi avaliada levando em consideração também as células da POP CD45+CD14-. O *dot-plot* apresentado em E mostra a nomenclatura adotada nos experimentos.

MAC CD14+ = macrófagos CD14+; TUMOR CD45- = células tumorais CD14-/CD45-; POP CD45+_CD14- = população que não expressa CD14 e tem autofluorescência para AmCyam, composta da população de MAC CD14- e TUMOR autofluorescente.

3.9 Quantificação de lactato extracelular

A quantificação de lactato extracelular foi realizada com a utilização do kit Lactato (InVitro, Minas Gerais, BR), de acordo com o protocolo do fabricante. Para a quantificação, foram utilizados sobrenadantes coletados no último dia de experimento (dia 10), antes do processamento dos esferoides.

3.10 Avaliação dos efeitos do CHC sobre coculturas de células tumorais da linhagem HeLa e monócitos de doadores saudáveis e pacientes

Nós tivemos a oportunidade de iniciar um piloto testando o efeito do CHC em coculturas de células tumorais da linhagem HeLa com monócitos de doadores saudáveis ou pacientes com câncer do colo uterino, possibilitando a comparação dos efeitos em células previamente moduladas pela existência de tumor. Como descrito no item 3.3, esferoides foram gerados com células da linhagem HeLa e, no quarto dia de cultura, os monócitos foram adicionados aos poços – diferente do que havia sido feito previamente, devido a disponibilidade de amostra, adicionamos cinquenta mil monócitos por poço, ao invés de sessenta e cinco mil. Logo em seguida, as células foram ou não tratadas com CHC. Após seis dias do tratamento, os poços foram recolhidos para análise por citometria de fluxo, da mesma forma descrita no item 3.6, com exceção de que, para esta linhagem de célula tumoral (HeLa), não foi necessária a digestão com colagenase. Os anticorpos utilizados para a marcação foram: CD14 APC (clone M5E2) e CD45 V500 ou Alexa 700 (H130), com posterior marcação com DAPI. Nestes experimentos também não foi utilizado o anticorpo anti-HLA-DR e, portanto, foram avaliadas apenas as populações TUMOR CD45- e MAC CD14+.

3.11 Análise estatística

Os dados foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Nos experimentos comparando a condição controle (CTRL), controle de solvente (DMSO) e os tratamentos, os dados com distribuição normal foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) unidirecional pareada, seguida do pós-teste de Tukey, enquanto os dados com distribuição não paramétrica foram analisados pelo teste de Friedman, seguido de pós-teste de Dunn. Os mesmos testes estatísticos foram aplicados para verificar diferenças entre o controle e o tratamento em diferentes tempos de cultura. Para a comparação de diferenças entre a monocultura e cocultura com o tratamento, foi realizada a ANOVA bidirecional pareada. Por fim, para os dados dos experimentos do piloto com pacientes de câncer do colo uterino, onde foi analisada apenas a condição controle (CTRL) e tratada com CHC (CHC), a análise realizada foi o teste T pareado para os dados com distribuição normal, enquanto os dados sem distribuição normal foram avaliados com o teste de Wilcoxon.

Os dados foram analisados de forma correlacionada, quando possível, pois os monócitos de um mesmo experimento são provenientes do mesmo doador; além disso, tratando-se de amostras humanas, há grande variabilidade entre os doadores e, desta forma, a análise correlacionada permite melhor interpretação dos dados, já que leva em conta a diferença entre as condições.

Diferenças entre grupos experimentais foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Padronização das doses dos inibidores (CHC e AZD 3965)

Nos estudos prévios de nosso laboratório que deram origem a este trabalho, a concentração de CHC utilizada para a realização dos experimentos foi estabelecida com base em objetivos diferentes do que os atuais – naquele estudo, os macrófagos eram expostos ao inibidor antes das células tumorais pois o objetivo era avaliar a inibição da captação de lactato pelos macrófagos. Como o objetivo atual é estudar o efeito do inibidor sobre ambas as células, mimetizando o que aconteceria *in vivo* com a administração do fármaco, foi realizada uma nova curva de dose-resposta com as doses de 2, 4 e 8 mM de CHC, utilizando monoculturas e coculturas de células tumorais e macrófagos. Devido à solubilidade do inibidor, não foi possível utilizar a mesma concentração de DMSO para todas as doses de CHC; desta forma, obtivemos concentração final de DMSO nos poços de 0.065%, 0.13% e 0.27% para as doses de 2, 4 e 8 mM, respectivamente. Nenhuma das concentrações de DMSO utilizadas levaram a alterações relevantes na frequência ou viabilidade das células, em qualquer condição testada (monoculturas ou coculturas) (**Figura 12**).

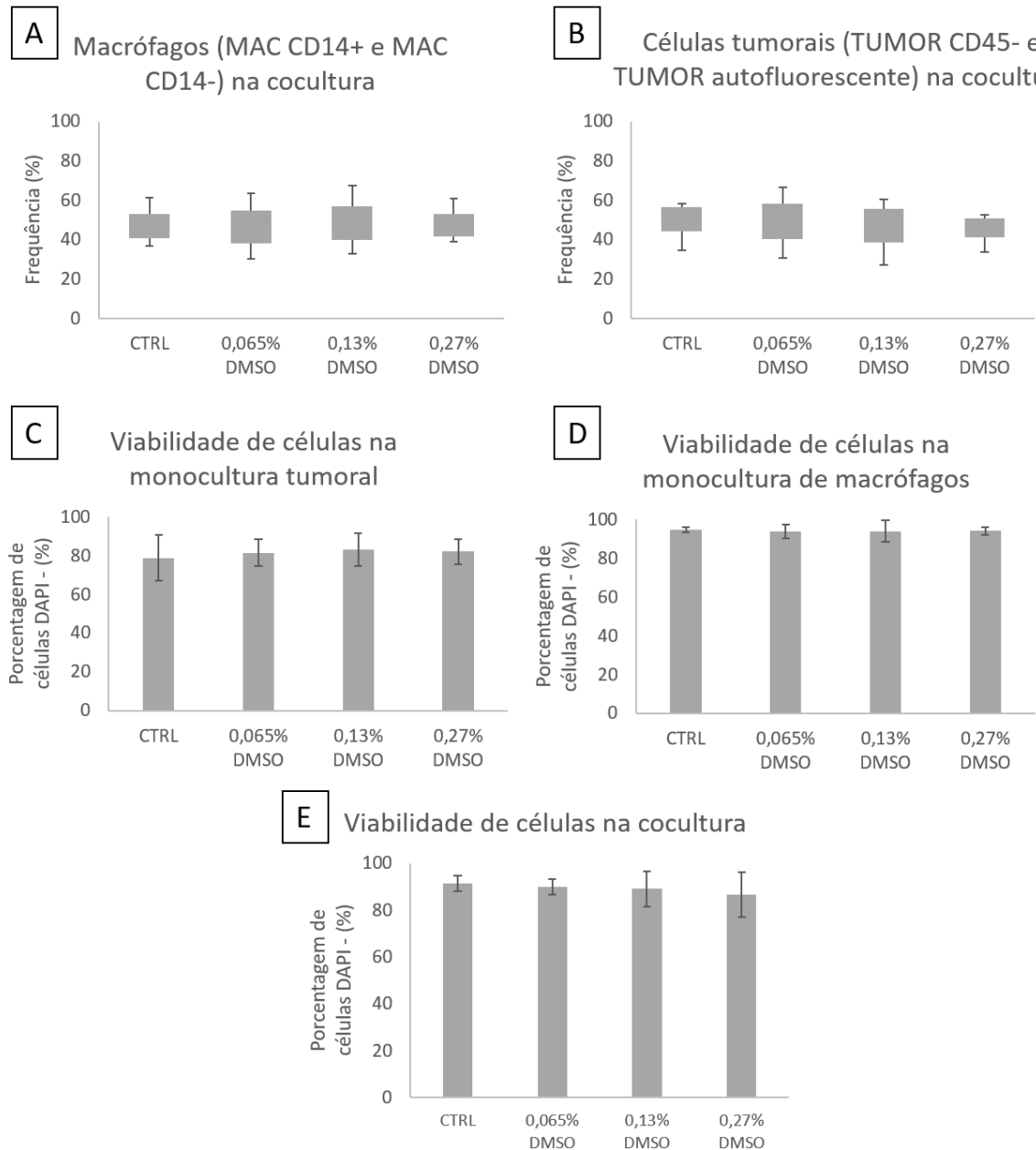


Figura 12. Médias das frequências de células nas coculturas e viabilidade média de células nas coculturas e monoculturas, após a adição de diferentes concentrações do solvente DMSO.

Gráficos com as médias e desvios padrões da frequência de células na cocultura (A e B) e da viabilidade das células nas coculturas e monoculturas (C, D e E), comparando a condição não tratada (CTRL) com as condições onde diferentes doses de DMSO foram adicionados aos poços no quarto dia de experimento (0,065% DMSO; 0,13% DMSO; 0,27% DMSO). (A) Frequência de macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-) na cocultura. (B) Frequência de células tumorais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) na cocultura. (C) Viabilidade de células na monocultura de células tumorais. (D) Viabilidade das células na monocultura de macrófagos. (E) Viabilidade na cocultura.

Todas as amostras foram submetidas ao teste estatístico ANOVA one-way com pós teste de Tukey, com o qual não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$). Foram adquiridos no mínimo dez mil eventos por amostra ($N=3$).

MAC CD14+ = macrófagos CD14+; MAC CD14- = macrófagos CD14-; TUMOR CD45- = células tumorais CD14-/CD45-; TUMOR autofluorescente = células tumorais autofluorescentes para AmCyam.

Em relação a concentração de CHC, foi possível observar que todas as doses causaram alterações na cocultura, pois é possível ver, inclusive, a mudança do padrão de tamanho e granulosidade das células, comparado com o controle não tratado, um efeito que fica mais visível nas doses de 4 e 8 mM (**Figura 13**). A concentração de 8 mM eliminou diretamente a população de células da monocultura tumoral, o que torna esta dose uma candidata a quimioterapia convencional, onde o objetivo é a toxicidade para células tumorais; porém, como observado aqui, esta abordagem não evita os efeitos adversos, tendo a monocultura de macrófagos também sido eliminada (**Figura 14**). Já concentração de 4 mM não eliminou as células da monocultura tumoral, apesar de ter causado diminuição da frequência destas células na cocultura (dados não mostrados) porém, causou aumento de *debris* celulares enquanto diminuiu expressivamente a população de macrófagos na monocultura destas células em dois de três experimentos (**Figura 15**). Como o objetivo deste estudo é prejudicar a viabilidade e/ou a proliferação de células tumorais causando o mínimo de efeitos negativos sobre macrófagos, a dose escolhida foi a de 2 mM, que não eliminou a população de macrófagos, apesar de causar alterações de tamanho e granulosidade dessas células (tanto na monocultura, quanto na cocultura) (**Figura 16**).

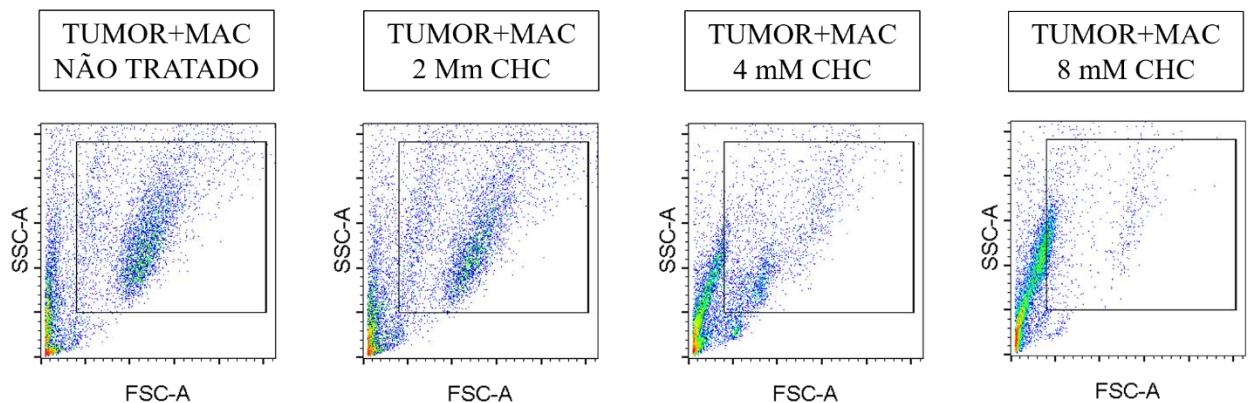


Figura 13. Tamanho e granulosidade de células da cocultura de esferoides tumorais com macrófagos após tratamento com diferentes concentrações de CHC.

Dot-plots representativos das citometrias de fluxo realizada com as amostras da cocultura, onde os tratamentos com 2, 4 e 8 mM de CHC foram testados. Os *dot-plots* mostram dados de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC) celular, e ilustram como a população muda de aspecto com os tratamentos com CHC. Foram adquiridos no mínimo dez mil eventos por amostra (N=3).

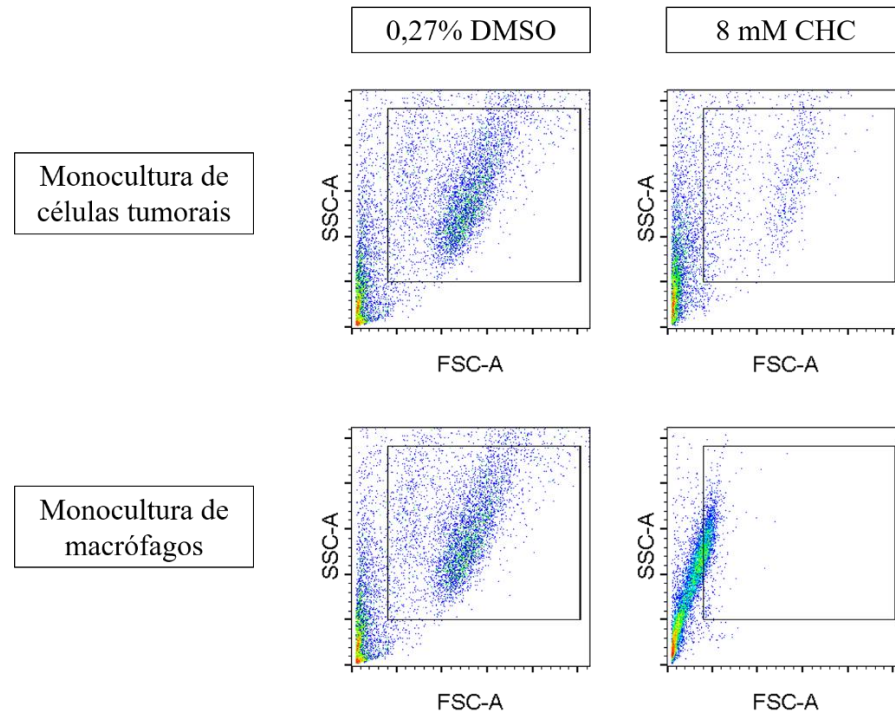


Figura 14. Tamanho e granulosidade de células das monoculturas de células tumorais e macrófagos com 0,27% DMSO e 8 mM de CHC.

Dot-plots representativos das citometrias de fluxo realizadas com amostras da monocultura de células tumorais (linha superior) e da monocultura de macrófagos (linha inferior) comparando os poços tratados com 8 mM de CHC (*dot-plots* da direita) com os poços que receberam a concentração de DMSO equivalente a presente no tratamento (0,27% DMSO; *dot-plots* da esquerda). Os *dot-plots* mostram dados de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC) celular e ilustram a expressiva diminuição de células com o tratamento com 8 mM de CHC, em relação aos grupos que receberam 0,27% de DMSO. Foram adquiridos no mínimo dez mil eventos por amostra (com exceção da monocultura tumoral tratada com 8 mM CHC, para qual foram adquiridos 5 mil eventos devido a um menor número de células ao final do tratamento) (N=3).

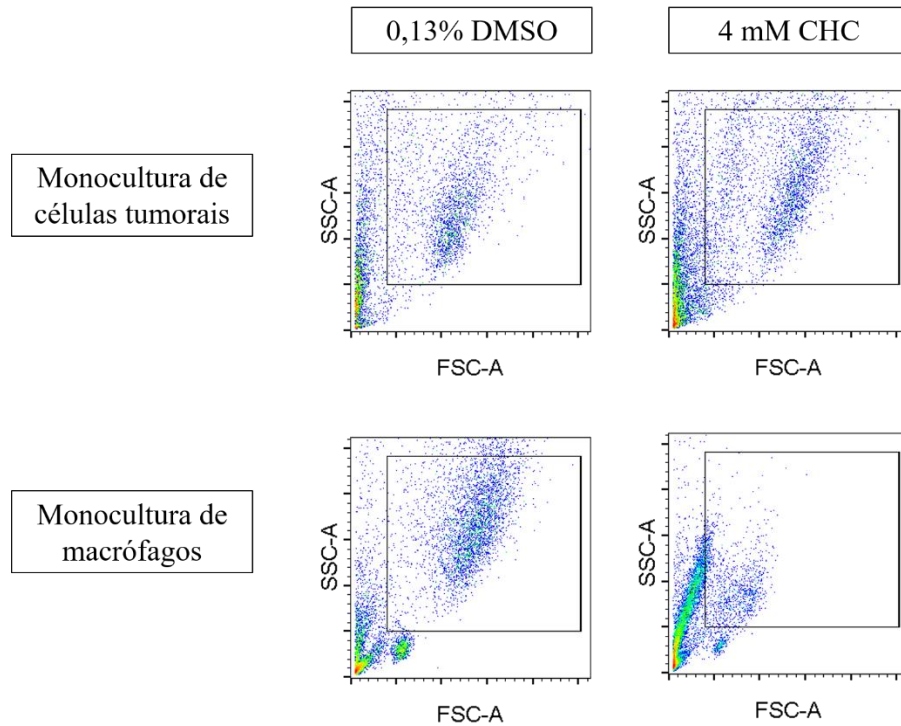


Figura 15. Tamanho e granulosidade de células das monoculturas de células tumorais e macrófagos com 0,13% DMSO e 4 mM de CHC.

Dot-plots representativos das citometrias de fluxo realizadas com amostras da monocultura de células tumorais (linha superior) e da monocultura de macrófagos (linha inferior) comparando os poços tratados com 4 mM de CHC (*dot-plots* da direita) com os poços que receberam a concentração de DMSO equivalente a presente no tratamento (0,13% DMSO; *dot-plots* da esquerda). Os *dot-plots* mostram dados de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC) celular e ilustram a expressiva diminuição de macrófagos na monocultura destas células com o tratamento de 4 mM de CHC, em relação a monocultura que recebeu 0,13% de DMSO, enquanto nenhum efeito foi observado sobre a monocultura de células tumorais. Foram adquiridos no mínimo dez mil eventos por amostra (N=3).

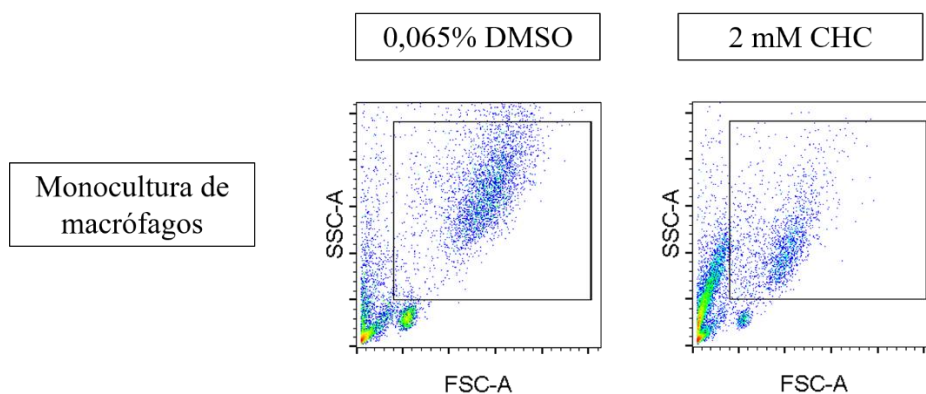


Figura 16. Tamanho e granulosidade de células das monoculturas de macrófagos com 0,065% DMSO e 2 mM de CHC.

Dot-plots representativos das citometrias de fluxo realizadas com amostras da monocultura de macrófagos comparando os poços tratados com 2 mM de CHC (*dot-plot* da direita) com os poços que receberam a concentração de DMSO equivalente a presente no tratamento (0,065% DMSO; *dot-plot* da esquerda). Os *dot-plots* mostram dados de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC) celular e ilustram os efeitos do tratamento de 2 mM de CHC sobre macrófagos. A dose de 2 mM resultou em diminuição

do tamanho e granulosidade dos macrófagos, porém, não causou diminuição expressiva da presença destas células na monocultura, diferente da dose de 4 mM de CHC. Foram adquiridos no mínimo dez mil eventos por amostra (N=3).

As doses escolhidas para o desenvolvimento do piloto de estudo de dose-resposta com o inibidor AZD 3965 – 5, 25 e 50 nM – foram selecionadas de acordo com o estudo de doses já utilizadas na literatura. Existem estudos utilizando concentrações de 2 nM até 500 nM, e na maioria destes estudos, o objetivo é atingir efeito citotóxico direto sobre células tumorais de diferentes linhagens (150-153). De acordo com o trabalho de Belouèche-Babari e colaboradores, de forma geral, linhagens tumorais são consideradas como sensíveis ao tratamento com AZD3965 quando respondem a doses menores que 100 nM, enquanto as que não respondem são consideradas resistentes; com base neste dado, decidimos que nossa maior concentração de teste seria a de 50 nM, optando por uma dose mais baixa do que o máximo determinado para as células sensíveis, buscando evitar efeitos negativos sobre macrófagos. Já a concentração mais baixa foi escolhida como de 5 nM pois neste mesmo trabalho, os autores já haviam identificado acúmulo de lactato intracelular com dose de 2 nM (153).

O AZD3965 também necessita ser diluído em DMSO para que seja solúvel em meio de cultura, porém, a quantidade de DMSO necessária para a diluição é menor do que 0,065% de DMSO e, portanto, o controle de solvente utilizado para os experimentos com este inibidor também foi a utilização de 0,065% DMSO, assim como para o CHC. Com os experimentos realizados, não foi possível observar diferença de efeito entre as doses, não ocorrendo diferença aparente entre o tamanho, granulosidade e frequência de células, na monocultura (não mostrado) ou cocultura (**Figura 17**). Portanto, a dose de 50 nM foi escolhida para aprofundamento dos estudos.

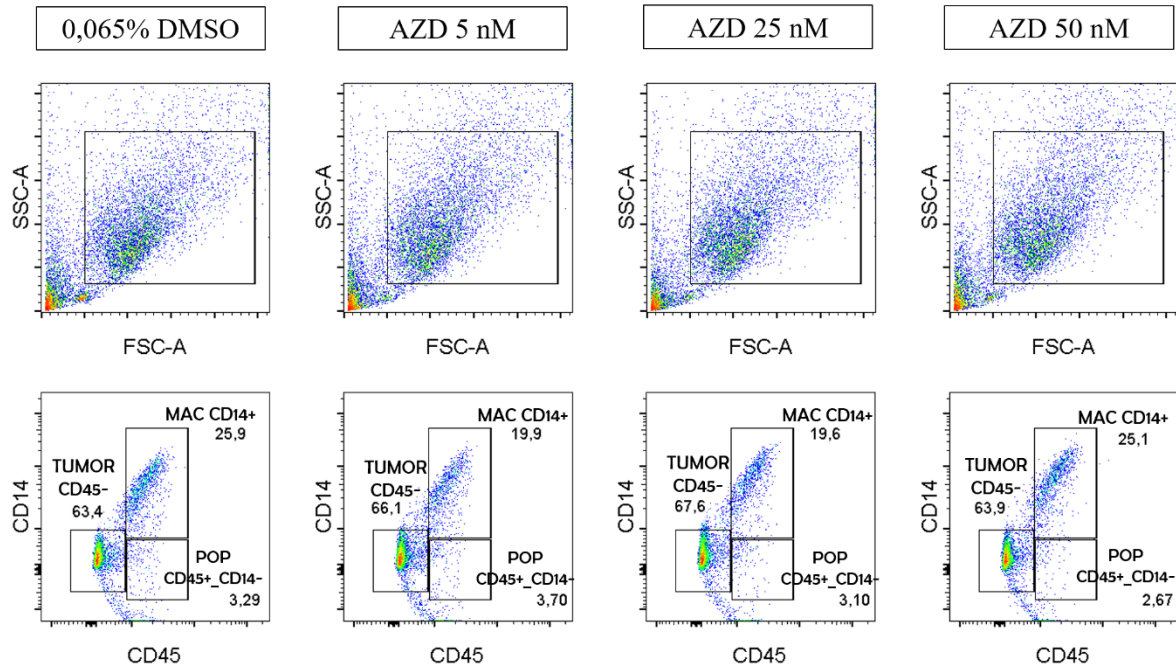


Figura 17. Tamanho, granulosidade e frequência de células nas coculturas para avaliação do efeito de diferentes concentrações de AZD 3965.

Dot-plots representativos das citometrias de fluxo realizada com as amostras da cocultura de células tumorais e macrófagos, onde os tratamentos com 5, 25 e 50 nM de AZD3965 foram testados, e estão sendo comparados a amostra que recebeu 0,065% DMSO. Os *dot-plots* superiores mostram dados de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC) celular, e ilustram como a população não muda de aspecto com os tratamentos com AZD3965. Os *dot-plots* inferiores ilustram a frequência de células na cocultura, a partir da marcação com anticorpo anti-CD14 e anti-CD45, evidenciando que não há mudanças nas frequências de células com os tratamentos. Foram adquiridos no mínimo dez mil eventos por amostra (N=2).

TUMOR CD45- = células tumorais CD14-/CD45-; MAC CD14+ = macrófagos CD14+; POP CD45+_CD14- = população que não expressa CD14 e tem autofluorescência para AmCyan, composta da população de MAC CD14- e TUMOR autofluorescente.

4.2 O tratamento com CHC causa a morte de células tumorais, mas não prejudica a viabilidade de macrófagos.

Neste trabalho, buscamos investigar se o tratamento com CHC poderia causar prejuízo às células tumorais, com menores efeitos negativos sobre os macrófagos, devido às suas diferenças metabólicas. Portanto, primeiramente foi avaliado o efeito do tratamento com este inibidor em coculturas de células tumorais e monócitos/macrófagos após seis dias de cocultura. Trabalhos prévios do laboratório demonstraram, por meio de fenotipagem por citometria de fluxo, que este período é suficiente para permitir a diferenciação de monócitos em macrófagos (40). Para melhor mimetizar a realidade de tumores, onde a administração de um tratamento exerce efeito

simultâneo sobre todas as células do microambiente, a cocultura foi tratada logo após a adição dos monócitos à ela. Para melhor compreender os efeitos que poderiam ser observados, também foram utilizadas monoculturas tratadas e não tratadas de ambas as células estudadas.

O tratamento com a dose de 2 mM de CHC causou aumento significativo da frequência (CTRL: $5,31 \pm 2,47$; DMSO: $4,6 \pm 1,67$; CHC: $23,88 \pm 9,54$) e número absoluto (CTRL: $2003,8 \pm 930,22$; DMSO: $1895,8 \pm 809,19$; CHC: $9278,14 \pm 5272,52$) de células CD45+/CD14-, o que pode ser observado na **Figura 18** e **Figura 19**, confirmando o que foi mostrado na seção de Materiais e Métodos. A população CD45+/CD14- corresponde a células tumorais mortas que passaram a apresentar autofluorescência para o canal AmCyam (TUMOR autofluorescente) e macrófagos que perderam a expressão de CD14 (MAC CD14-). Sendo assim, para compreender os efeitos do tratamento, foi contabilizado o total de cada população (células tumorais e macrófagos) considerando as células CD45+/CD14-, de acordo com a estratégia discutida previamente na seção de Materiais e Métodos. Portanto, a população total de macrófagos corresponde às subpopulações MAC CD14+ e MAC CD14-, enquanto a população de células tumorais corresponde às subpopulações TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente.

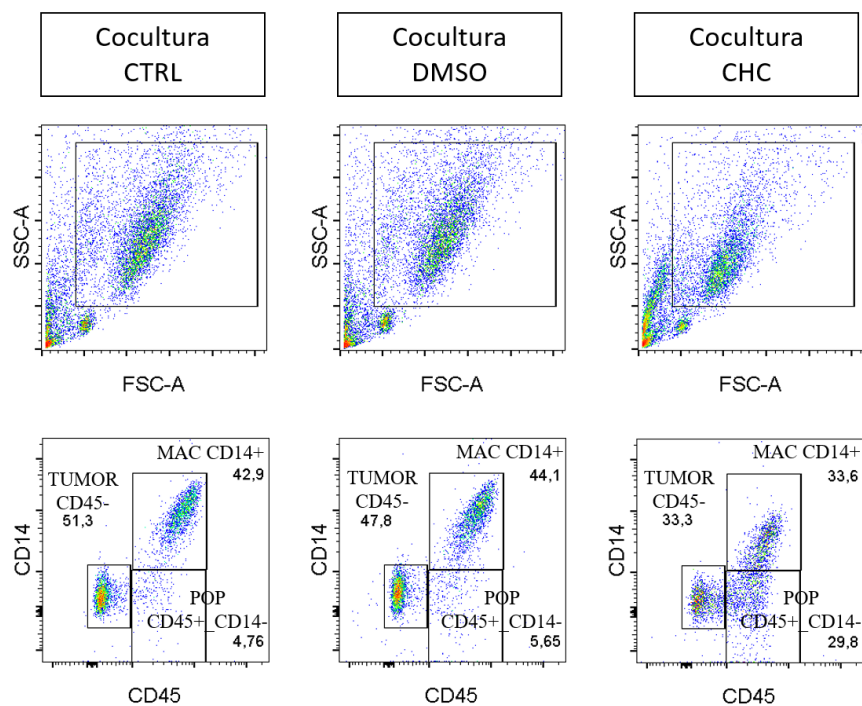


Figura 18. Tamanho, granulosidade e frequência de células nas coculturas de células tumorais com macrófagos.

Dot-plots das citometrias de fluxo realizadas com as amostras das coculturas de células tumorais da linhagem SW756 com macrófagos de doadores saudáveis, representativos de cinco experimentos

independentes. A linha superior corresponde aos *dot-plots* de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC), enquanto a linha inferior corresponde a *dot-plots* de CD14 por CD45, provenientes dos “gates” da linha superior. Os dados relativos ao controle (CTRL), controle de solvente (DMSO) e tratamento com 2 mM de CHC (CHC) são mostrados da esquerda para a direita. Foram adquiridos, no mínimo, dez mil eventos por amostra.

TUMOR CD45- = células tumorais CD14-/CD45-; MAC CD14+ = macrófagos CD14+; POP CD45+_CD14- = macrófagos CD14- (MAC CD14-) e células tumorais autofluorescentes para AmCyam (TUMOR autofluorescente).

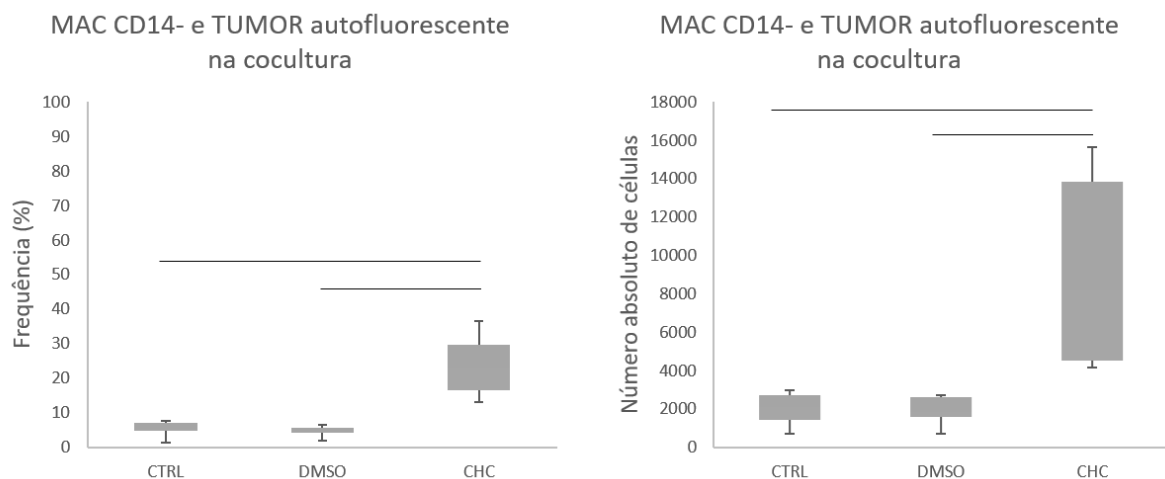


Figura 19. Frequências e números absolutos de células CD45+/CD14- (MAC CD14- e TUMOR autofluorescente) na cocultura de células tumorais com macrófagos.

A frequência (esquerda) e número absoluto (direita) de células CD45+/CD14- (que correspondem a MAC CD14- e TUMOR autofluorescente) são mostradas em gráficos, para as três condições estudadas nos experimentos com a linhagem tumoral SW756: controle (CTRL), controle de solvente (DMSO) e tratamento com 2 mM de CHC (CHC). As barras indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Dados provenientes de cinco experimentos independentes.

MAC CD14- = macrófagos CD14-; TUMOR autofluorescente = células tumorais autofluorescentes para AmCyam.

Não foi possível observar alterações significativas com o tratamento ao analisar a frequência e número absoluto do total de células tumorais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) na cocultura (**Figura 20A**). Porém, interessante, ao analisar estes parâmetros em relação a células vivas e mortas na cocultura, foi observado que, em concordância com a hipótese inicial, o tratamento causou diminuição significativa da frequência de células tumorais vivas e aumento significativo da frequência e número absoluto de células tumorais mortas (**Figura 20B**). Estatisticamente, a diminuição da frequência de células tumorais vivas não obteve reflexo em número absoluto, apesar de haver uma clara tendência, o que pode ser resultado, por exemplo, do tamanho amostral. Já em relação aos macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-),

foi observado que o tratamento não acarretou alterações na frequência e número absoluto destas células, tanto ao olhar o total, como também células vivas e mortas (**Figura 21**). Desta forma, o tratamento mostrou ser capaz de trazer prejuízo à viabilidade de células tumorais, sem acarretar estes danos aos macrófagos. A **Tabela 1** e a **Tabela 2** mostram os valores das médias e desvios padrões das amostras em relação aos parâmetros acima comentados.

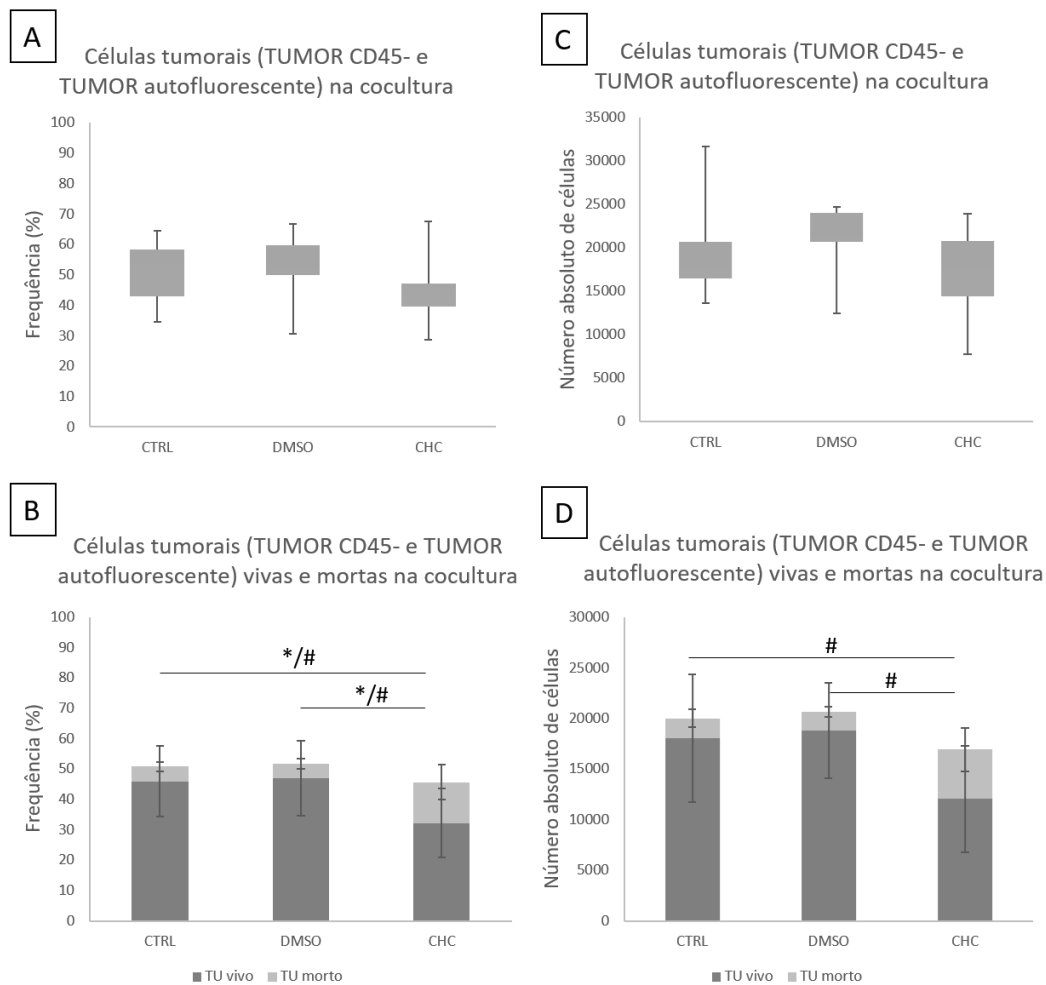


Figura 20. Frequências e número absolutos de células tumorais totais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) na cocultura de esferoides com macrófagos.

A frequência (A e B) e número absoluto (C e D) de células tumorais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) da linhagem SW756 na cocultura são mostrados em gráficos, para as três condições estudadas: controle (CTRL), controle de solvente (DMSO) e tratamento com 2 mM CHC (CHC). A linha superior (A e C) corresponde aos dados de frequência e número absoluto do total de células tumorais, enquanto a linha inferior (B e D) corresponde à frequência e número absoluto de células tumorais vivas e mortas (TU = células tumorais). As barras indicam diferença estatística, onde o símbolo * corresponde a diferenças entre o valor de células vivas e o símbolo # corresponde a diferenças entre o valor de células mortas ($p < 0,05$). Dados provenientes de cinco experimentos independentes.

TUMOR CD45- = células tumorais CD14-/CD45-; TUMOR autofluorescente = células tumorais autofluorescentes para AmCyam.

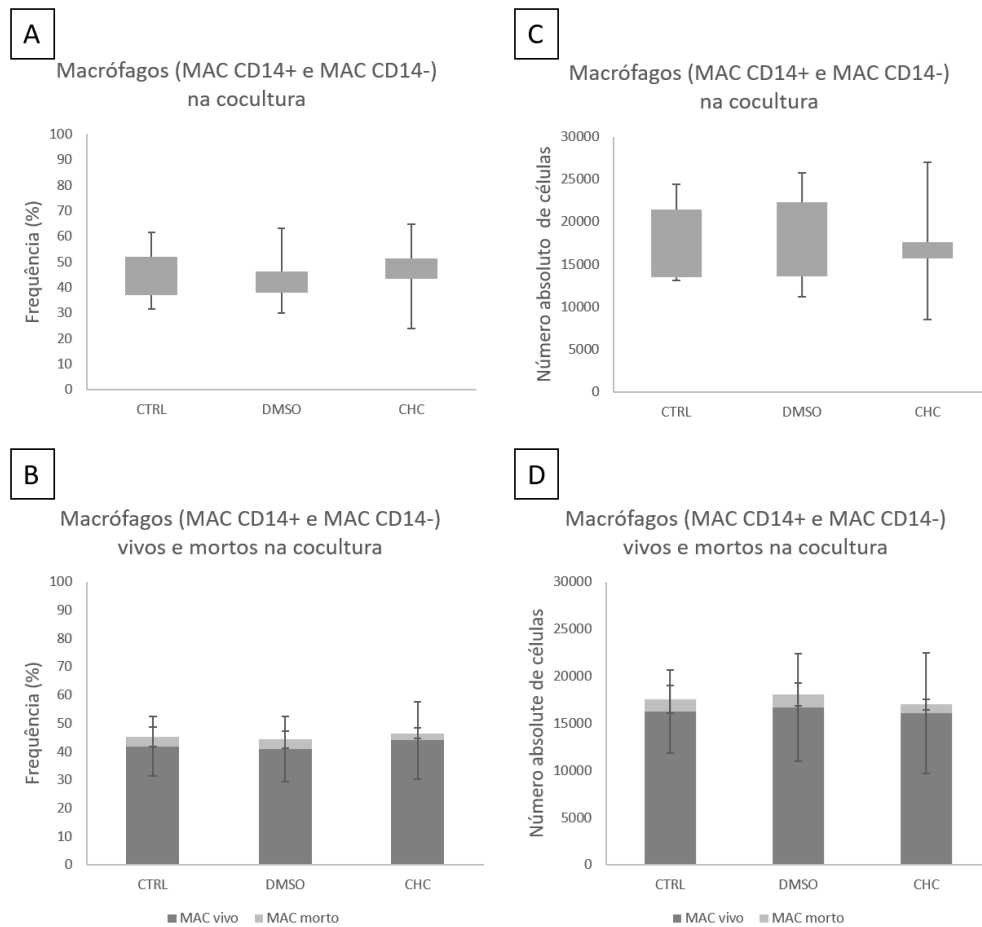


Figura 21. Frequências e número absolutos de macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-) na cocultura de esferoides com macrófagos.

A frequência (A e B) e número absoluto (C e D) de macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-) na cocultura com células tumorais da linhagem SW756 são mostrados em gráficos, para as três condições estudadas: controle (CTRL), controle de solvente (DMSO) e tratamento com 2 mM CHC (CHC). A linha superior (A e C) corresponde aos dados de frequência e número absoluto do total de macrófagos, enquanto a linha inferior (B e D) corresponde à frequência e número absoluto de macrófagos vivos e mortos (MAC = macrófagos). Não existem diferenças estatísticas entre os dados analisados ($p < 0,05$). Dados provenientes de cinco experimentos independentes.

MAC CD14+ = macrófagos CD14+; MAC CD14- = macrófagos CD14-.

Tabela 1. Médias e desvios padrões das frequências (%) de células nas coculturas.

Valores calculados a partir de cinco experimentos independentes.

Amostra	CTRL	DMSO	CHC
Células tumorais totais	50,83 ± 12,08	51,71 ± 13,55	45,64 ± 14,27
Células tumorais vivas	45,92 ± 11,59	46,96 ± 12,4	32,2 ± 11,38
Células tumorais mortas	4,91 ± 1,56	4,75 ± 1,71	13,45 ± 5,78
Macrófagos totais	45,25 ± 11,87	44,38 ± 12,3	46,61 ± 14,88
Macrófagos vivos	41,96 ± 10,5	40,89 ± 11,51	44,03 ± 13,65
Macrófagos mortos	3,29 ± 3,43	3,48 ± 3,08	2,58 ± 1,98

Tabela 2. Médias e desvios padrões dos números absolutos de células nas coculturas.

Valores calculados a partir de cinco experimentos independentes.

Amostra	CTRL	DMSO	CHC
Células tumorais totais	20027,2 ± 6970,02	20662 ± 4896,17	16927,8 ± 6224,48
Células tumorais vivas	18046 ± 6334,6	18789 ± 4703,8	12059 ± 5251,8
Células tumorais mortas	1981,6 ± 873,83	1864,2 ± 526,59	4868,7 ± 2153,1
Macrófagos totais	17583,5 ± 5063,32	18103,7 ± 5994,67	17031,2 ± 6601,27
Macrófagos vivos	16288 ± 4393,3	16690 ± 5678,1	16135 ± 6386,7
Macrófagos mortos	1295,6 ± 1444,2	1413,6 ± 1234,5	896,62 ± 580,15

O efeito do tratamento sobre as células também foi observado nas monoculturas de forma semelhante, tanto para as células tumorais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) como para os macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-). Como pode ser visualizado na **Figura 22A**, nenhuma das condições mostrou diferença significativa em relação ao número total de células nas monoculturas. Enquanto isso, analisando células vivas e mortas, foi observado que o tratamento também causou, de forma significativa, a diminuição da frequência de células tumorais vivas e o aumento da frequência de células tumorais mortas na monocultura. Em relação ao número absoluto de células, houve aumento significativo do número de células mortas com o tratamento, apenas em comparação ao grupo tratado com DMSO, apesar de ser possível visualizar a mesma diferença em relação ao grupo controle (**Figura 22B**). Semelhante a cocultura, uma possibilidade é que isto seja resultado do tamanho amostral, já que amostras humanas possuem grande variabilidade. Sendo assim, nós acreditamos que um aumento do número de indivíduos no estudo poderia diluir a variabilidade e permitir a visualização de diferença estatística com o controle também, tanto para as células vivas como para as mortas. Já em relação aos macrófagos, igualmente à cocultura, não foram observadas alterações de viabilidade com o tratamento (**Figura 22C**). Inesperadamente, foi observado que para alguns dos doadores envolvidos no estudo, o tratamento causou aumento do número total de macrófagos, como pode ser visualizado no gráfico pelo aumento da média na barra referente ao tratamento na monocultura (**Figura 22A e C**), porém, apesar de chamar atenção visualmente, esta diferença não se mostrou estatística. A **Tabela 3** e a **Tabela 4** mostram os valores de média e desvio padrão dos dados apresentados.

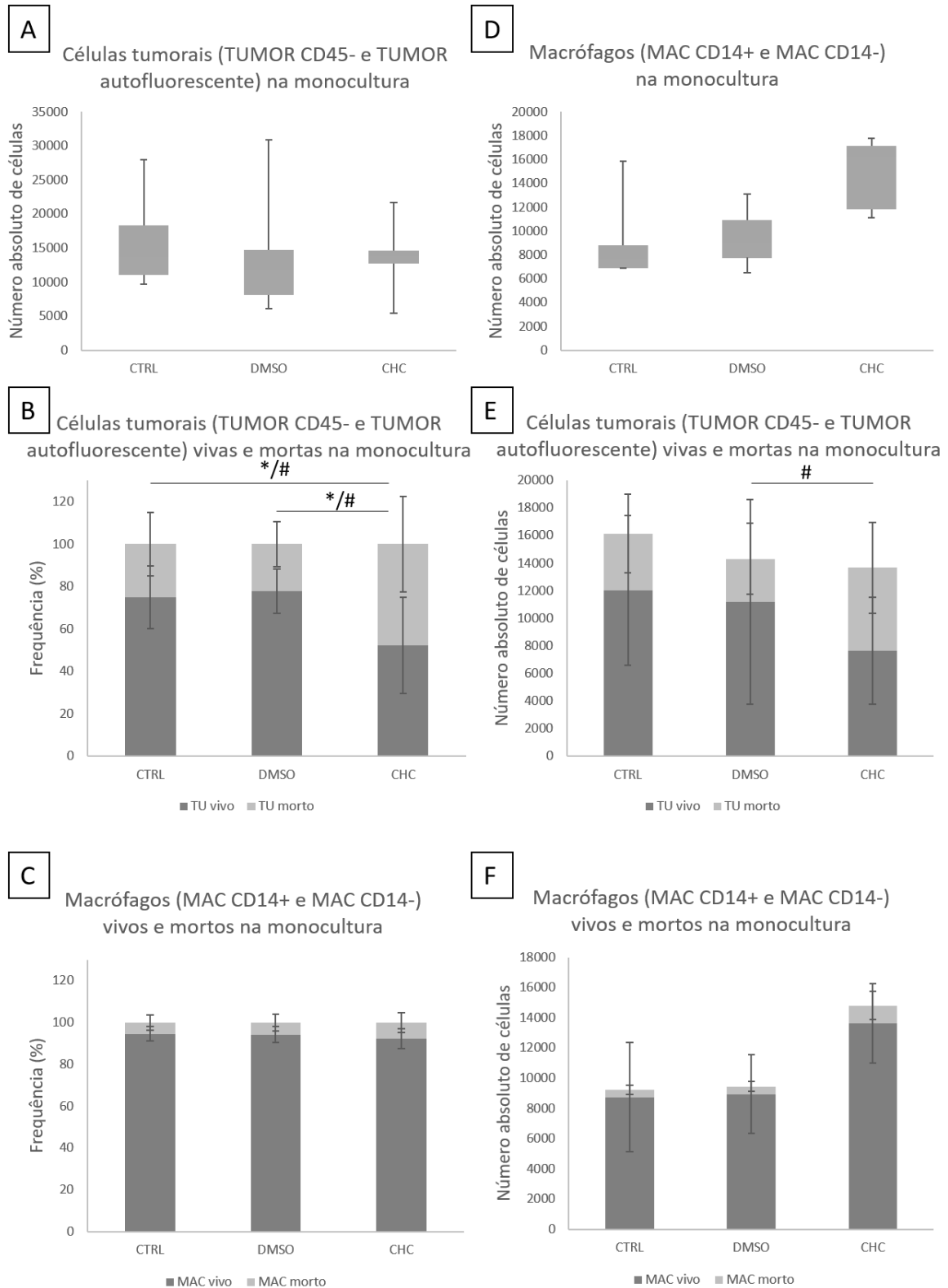


Figura 22. Frequências e número absolutos de células tumorais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) e macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-) em suas respectivas monoculturas. A frequência e número absoluto de células tumorais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) e macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-) dos experimentos envolvendo a linhagem SW756 e monócitos de doadores saudáveis são mostrados em gráficos, para as três condições estudadas: controle (CTRL), controle de solvente (DMSO) e tratamento com 2 mM CHC (CHC). (A) Número absoluto do

total de células tumorais na monocultura. (B) Frequência de células tumorais vivas e mortas na monocultura. (C) Frequência de macrófagos vivos e mortos na monocultura. (D) Número absoluto do total de macrófagos na monocultura. (E) Número absoluto de células tumorais vivas e mortas na monocultura. (F) Número absoluto de macrófagos vivos e mortos na monocultura. As barras indicam diferença estatística, onde o símbolo * corresponde a diferenças entre o valor de células vivas e o símbolo # corresponde a diferenças entre o valor de células mortas ($p < 0,05$). Dados provenientes de cinco experimentos independentes. (TU = células tumorais; MAC = macrófagos). TUMOR CD45- = células tumorais CD14-/CD45-; TUMOR autofluorescente = células tumorais autofluorescentes para AmCyan; MAC CD14+ = macrófagos CD14+; MAC CD14- = macrófagos CD14-.

Tabela 3. Médias e desvios padrões das frequências (%) de células nas monoculturas.

Valores calculados a partir de cinco experimentos independentes.

Amostra	CTRL	DMSO	CHC
Células tumorais vivas	74,84 ± 14,83	77,8 ± 10,51	52,28 ± 22,56
Células tumorais mortas	25,16 ± 14,83	22,2 ± 10,51	47,72 ± 22,56
Macrófagos vivos	94,7 ± 3,6	94,38 ± 3,95	92,38 ± 4,74
Macrófagos mortos	5,3 ± 3,6	5,62 ± 3,95	7,62 ± 4,74

Tabela 4. Médias e desvios padrões dos números absolutos de células nas monoculturas.

Valores calculados a partir de cinco experimentos independentes.

Amostra	CTRL	DMSO	CHC
Células tumorais totais	16153,3 ± 7345,18	14325 ± 9812,14	13661,7 ± 5789,99
Células tumorais vivas	12013 ± 5424,1	11196 ± 7445,4	7637,1 ± 3864,9
Células tumorais mortas	4140,6 ± 2856,6	3129,4 ± 2558,9	6024,6 ± 3315,3
Macrófagos totais	9250 ± 3763,4	9475 ± 2616,32	14820 ± 3106,17
Macrófagos vivos	8768,2 ± 3624,1	8968,3 ± 2590,7	13634 ± 2637,3
Macrófagos mortos	481,83 ± 305,67	506,75 ± 339,78	1185,8 ± 929,71

O trabalho de Stone e colaboradores mostrou que o cultivo de células tumorais com monócitos/macrófagos resulta em aumento da viabilidade daquelas células após seis dias de cocultura, evidenciando que as células mielóides são moduladas pelo tumor para promover o crescimento tumoral (40). De forma semelhante, a cocultura de células tumorais com macrófagos nestes experimentos também causou aumento significativo da viabilidade (frequência de células vivas) das células tumorais em relação a monocultura, em todas as condições envolvidas no estudo – controle (CTRL), controle de solvente (DMSO) e tratamento com CHC (CHC) (**Figura 23A, Tabela 5**), enquanto não acarretou diferenças para a viabilidade dos macrófagos (**Figura 23B, Tabela 5**). Porém, um achado importante deste trabalho é que, apesar de mesmo com o tratamento com CHC haver aumento da viabilidade das células

tumorais na presença de macrófagos, a viabilidade destas células ainda é significativamente menor do que nas coculturas controles, não apresentando diferença com as monoculturas controles. Assim como nas figuras anteriores, a viabilidade foi analisada considerando a população total de células tumorais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) e a população total de macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-).

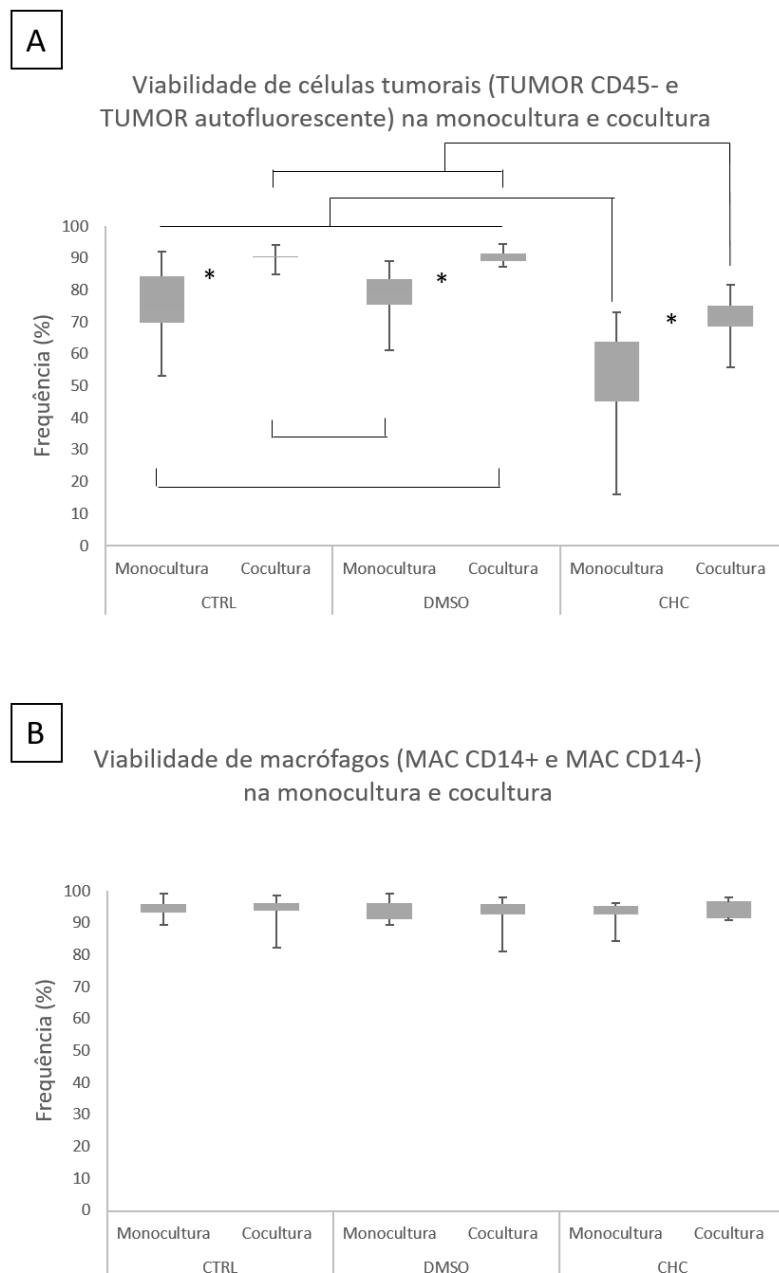


Figura 23. Frequência de células tumorais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) e macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-) vivos nas monoculturas e coculturas.

Frequência de células tumorais (A) e macrófagos (B) vivos (equivalentes as células DAPI-) nas monoculturas e coculturas em três diferentes condições: controle (CTRL), controle de solvente (DMSO)

e tratamento com 2 mM CHC (CHC). A população de células tumorais é composta de TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente, enquanto a população de macrófagos é composta pelas subpopulações MAC CD14+ e MAC CD14-. Os dados foram submetidos a ANOVA bidirecional, onde as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O símbolo * indica diferença entre os pares (monocultura:cocultura), enquanto as barras indicam diferenças entre as condições (CTRL, DMSO, CHC). Valores provenientes de cinco experimentos independentes.

TUMOR CD45- = células tumorais CD14-/CD45-; TUMOR autofluorescente = células tumorais autofluorescentes para AmCyam; MAC CD14+ = macrófagos CD14+; MAC CD14- = macrófagos CD14-.

Tabela 5. Médias e desvios padrões das frequências (%) de células vivas (DAPI).

Valores calculados a partir de cinco experimentos independentes.

Amostra	CTRL	DMSO	CHC
Células tumorais - Monocultura	74,84 ± 14,83	77,8 ± 10,51	52,28 ± 22,56
Células tumorais - Cocultura	90,1 ± 3,31	90,66 ± 2,65	70,57 ± 9,56
Macrófagos - Monocultura	94,7 ± 3,6	94,38 ± 3,95	92,38 ± 4,74
Macrófagos - Cocultura	93,28 ± 6,37	92,32 ± 6,64	94,75 ± 3,16

Apesar da presença dos macrófagos resultar em maior viabilidade das células tumorais, ainda existia a possibilidade de que, em relação aos controles, a diminuição da viabilidade com o tratamento com CHC fosse maior na cocultura do que na monocultura. Sendo assim, para compreender se os efeitos do tratamento observados sobre a viabilidade das células tumorais eram ou não intensificados pela presença dos macrófagos, nós investigamos se a taxa de morte tumoral (levando em conta as subpopulações TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) é maior na cocultura tratada do que na monocultura tratada. Para isso, nós calculamos a razão da frequência de células tumorais mortas com o tratamento sobre a frequência de células tumorais mortas com o controle de solvente (DMSO). A razão foi feita em relação ao controle de solvente (DMSO) e não em relação ao controle (CTRL) pois, como o solvente está sempre presente no tratamento, esta condição é a mais adequada para se escolher como controle. Como pode ser observado na **Figura 24**, apesar de haver aparente maior taxa de morte na cocultura, isto não se mostrou significativamente diferente da taxa na monocultura (CHC/DMSO monocultura: $2,17 \pm 0,23$; CHC/DMSO cocultura: $3,29 \pm 1,18$) e, portanto, não é possível afirmar que os macrófagos, tratados juntamente com as células tumorais na cocultura, possam estar intensificando a morte das células tumorais.

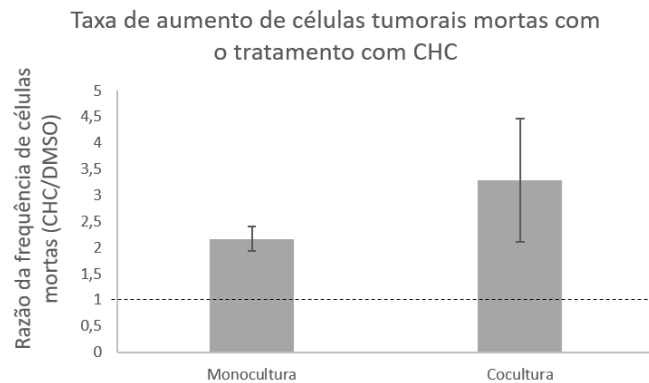


Figura 24. Razão da frequência de células tumorais mortas com o tratamento com CHC em relação ao controle de solvente (DMSO) na cocultura e monocultura de células tumorais.

A taxa de aumento de células tumorais mortas foi calculada através da divisão da frequência de células mortas no tratamento com CHC pela frequência de células tumorais mortas na condição controle de solvente (DMSO). A taxa foi calculada para as células da monocultura tumoral e para as células tumorais provenientes da cocultura com macrófagos, e os valores foram submetidos à análise estatística onde foi constatado que não há diferença entre estes valores. Uma linha tracejada foi posicionada no eixo horizontal na posição correspondente ao valor “1” para indicar que valores acima disto caracterizam aumento da frequência de células mortas com o tratamento em relação ao DMSO. Para o cálculo das células mortas, foi levado em consideração as células DAPI+ de ambas as subpopulações TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente. Valores provenientes de cinco experimentos independentes.

TUMOR CD45- = células tumorais CD14-/CD45-; TUMOR autofluorescente = células tumorais autofluorescentes para AmCyam.

Sendo assim, em conjunto os dados desta seção mostraram que o tratamento não prejudica a viabilidade de macrófagos, enquanto é capaz de causar danos diretamente às células tumorais, de forma independente de macrófagos. Além disso, de acordo com os resultados provenientes da análise de viabilidade, foi possível concluir que, apesar da presença de macrófagos resultar em aumento de viabilidade das células tumorais em todas as condições, a viabilidade na cocultura tratada ainda é menor que nas coculturas controles; ou seja, mesmo na presença de macrófagos, o tratamento foi capaz de resultar em menor viabilidade tumoral, o que indica que o CHC foi capaz de contornar, em partes, os efeitos pró-tumorais da presença de macrófagos na cultura, apesar de não ter eliminado totalmente a contribuição destas células à viabilidade das células tumorais.

Outra conclusão importante a partir dos dados mostrados até o momento é de que a concentração de DMSO utilizada realmente não exerce efeito sobre os parâmetros avaliados já que, em nenhuma das condições avaliadas, foi observada diferença estatística entre o controle (CTRL) e o controle de solvente (DMSO) e, portanto, é possível afirmar que todos os efeitos observados com o CHC são decorrentes da ação do inibidor e não do solvente utilizado para

diluição do mesmo. Por esse motivo, deste momento em diante ambas as condições controle (CTRL) e controle de solvente (DMSO) serão chamadas conjuntamente de “controles”, quando conveniente.

4.3 O tratamento com CHC altera tamanho, granulosidade e expressão de CD14 dos macrófagos.

O tratamento com CHC não mostrou exercer efeito sobre a frequência total de macrófagos, porém, outros efeitos foram observados. Primeiramente, como comentado na seção 4.1, o CHC causou diminuição do tamanho e granulosidade dos macrófagos em sua monocultura e na cocultura com células tumorais, em comparação com os controles (CTRL e DMSO) em todos os experimentos realizados. Este mesmo efeito não foi observado com as células tumorais, sendo, portanto, específico dos macrófagos.

O tratamento com 2 mM de CHC causou aumento expressivo da quantidade de macrófagos que perderam a expressão de CD14 (MAC CD14-), uma subpopulação muito pouco presente nas condições controle (CTRL e DMSO). A **Figura 25**, a **Tabela 6** e a **Tabela 7** mostram as médias e desvios padrões das subpopulações de macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-) na cocultura e monocultura. É possível observar que o tratamento com CHC causou aumento significativo da frequência e número absoluto de macrófagos CD14- na cocultura, enquanto não houve diminuição significativa da frequência e número de macrófagos CD14+ na cocultura (**Figura 25A e C**).

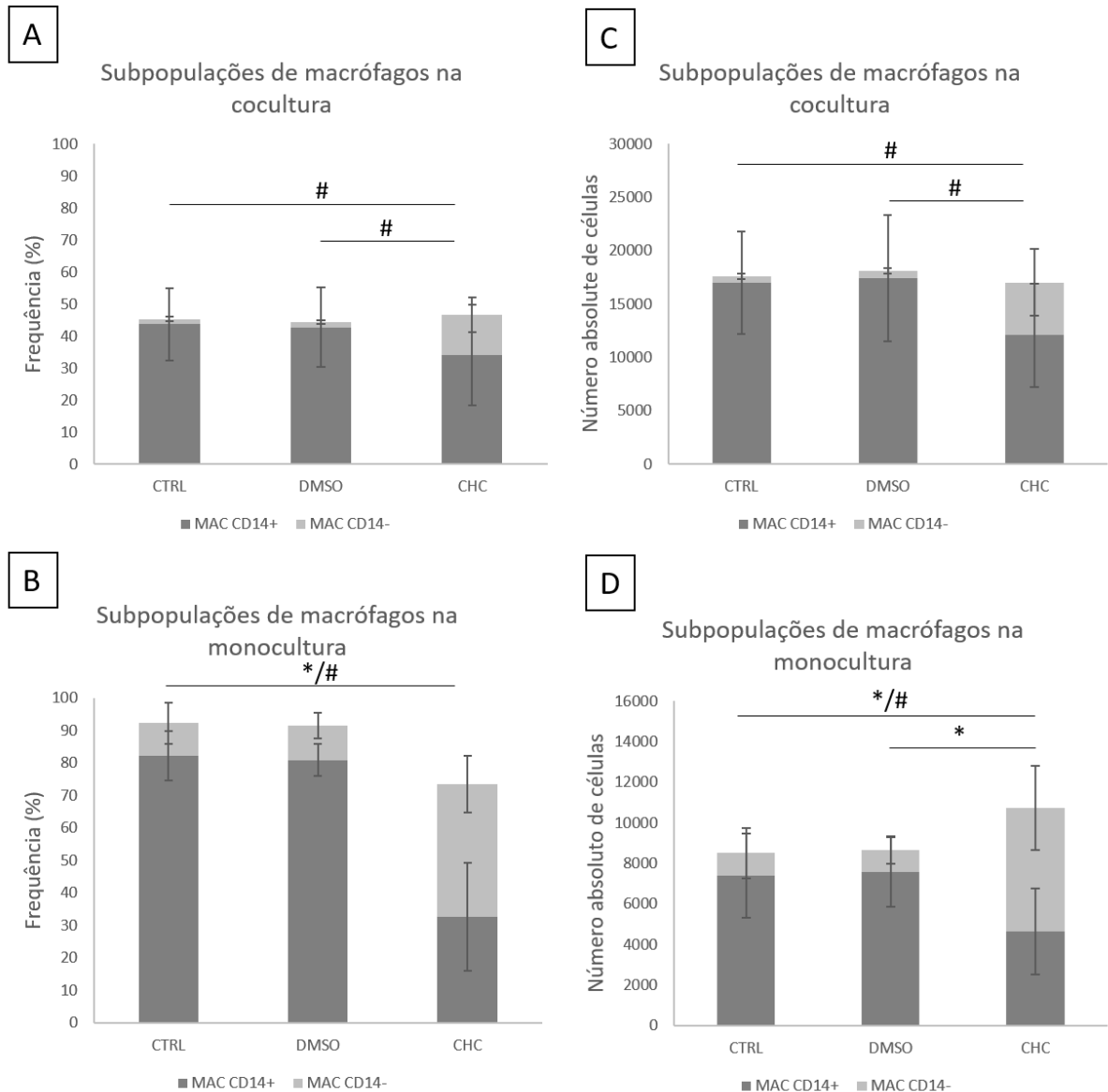


Figura 25. Frequência e número absoluto de células das subpopulações de macrófagos na cocultura e monocultura.

A frequência e número absoluto de células das subpopulações de macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-) derivados de doadores saudáveis, cultivados sozinhos (monocultura) ou com células tumorais da linhagem SW756 (cocultura), são mostrados em gráficos, para as três condições estudadas: controle (CTRL), controle de solvente (DMSO) e tratamento com 2 mM CHC (CHC). (A) Frequência de macrófagos CD14+ e CD14- na cocultura. (B) Frequência de macrófagos CD14+ e CD14- na monocultura. (C) Número absoluto de macrófagos CD14+ e CD14- na cocultura. (D) Número absoluto de macrófagos CD14+ e CD14- na monocultura. As barras indicam diferença estatística, onde o símbolo * corresponde a diferenças entre o valor de MAC CD14+ e o símbolo # corresponde a diferenças entre o valor de MAC CD14- ($p < 0,05$). Dados provenientes de cinco experimentos independentes. MAC CD14+ = macrófagos CD14+; MAC CD14- = macrófagos CD14-.

Já na monocultura, o tratamento foi responsável pela diminuição e aumento significativo da frequência das subpopulações MAC CD14+ e MAC CD14-, respectivamente, em relação ao

controle (CTRL). O mesmo resultado foi obtido na análise do número absoluto de células. Apesar de visualmente parecer apresentar as mesmas diferenças com o controle de solvente (DMSO), o tratamento com CHC não apresentou diferença estatística com aquela condição em relação a frequência de células, enquanto apresentou diminuição significativa do número de macrófagos CD14+ em comparação com o DMSO (**Figura 25B e D**). Novamente, parece que a variabilidade é provavelmente o fator responsável por estas diferenças na estatística, já que os dados do CTRL e DMSO seguem, durante todo o trabalho, apresentação extremamente semelhante. A menor frequência total de macrófagos (somando as células das subpopulações MAC CD14+ e MAC CD14-) observada na monocultura tratada com CHC (**Figura 25B**) ocorre porque, em alguns experimentos, o tratamento causa o aparecimento de uma terceira pequena subpopulação que não expressa CD14 nem CD45, apesar de as células estarem vivas. No entanto, isto não se repete ao analisar o número absoluto de células pois, apesar de não ser significativo, é possível observar tendência de maior número total de macrófagos com o tratamento.

Tabela 6. Médias e desvios padrões das frequências (%) das subpopulações de macrófagos na monocultura e cocultura.

Valores calculados a partir de cinco experimentos independentes.

Amostra	CTRL	DMSO	CHC
MAC CD14+ Cocultura	43,7 ± 11,23	42,78 ± 12,33	34,06 ± 15,73
MAC CD14- Cocultura	1,55 ± 0,69	1,6 ± 0,48	12,55 ± 5,39
MAC CD14+ Monocultura	82,36 ± 7,69	80,94 ± 4,96	32,86 ± 16,62
MAC CD14- Monocultura	10,02 ± 6,34	10,75 ± 3,89	40,70 ± 8,71

MAC CD14+ = macrófagos CD14+; MAC CD14- = macrófagos CD14-.

Tabela 7. Médias e desvios padrões dos números absolutos das subpopulações de macrófagos na monocultura e cocultura.

Valores calculados a partir de cinco experimentos independentes.

Amostra	CTRL	DMSO	CHC
MAC CD14+ Cocultura	16991 ± 4828,5	17445 ± 5901,4	12090 ± 4852,2
MAC CD14- Cocultura	592,06 ± 279,17	658,59 ± 272,68	4940,9 ± 3146,9
MAC CD14+ Monocultura	7397,7 ± 2084,1	7587,8 ± 1716,7	4652,4 ± 2114,2
MAC CD14- Monocultura	1116,2 ± 1255,2	1086,5 ± 670,15	6095,5 ± 2060,7

MAC CD14+ = macrófagos CD14+; MAC CD14- = macrófagos CD14-.

Além do aumento significativo da frequência da subpopulação MAC CD14⁻, o tratamento também trouxe diferenças na expressão de CD14 nos macrófagos CD14⁺. O CHC causou diminuição significativa na expressão dessa molécula tanto na monocultura (CTRL: 6676,4 ± 2771,7; DMSO: 6849,8 ± 3295,1; CHC: 3170,2 ± 1350,1) quanto na cocultura (CTRL: 10784 ± 4725,7; DMSO: 10928 ± 4577,2; CHC: 4308,4 ± 1589,4); a expressão de CD14 entre ambas estas condições não é diferente, e ambas são menores do que a expressão de CD14 nas monoculturas e coculturas controles (CTRL e DMSO). De fato, nas condições controles, há aumento da expressão de CD14 na cocultura, em relação a monocultura (**Figura 26A**). A **Figura 26B** sumariza o que foi descrito sobre a subpopulação MAC CD14⁺, mostrando simultaneamente as diferenças de frequência e expressão (Número de eventos *versus* Intensidade de fluorescência). Estes dados mostram que as células tumorais provocam aumento da expressão de CD14 pelos macrófagos da subpopulação MAC CD14⁺, porém, o tratamento com CHC abole este efeito, resultando em significativa menor expressão dessa molécula na monocultura e cocultura.

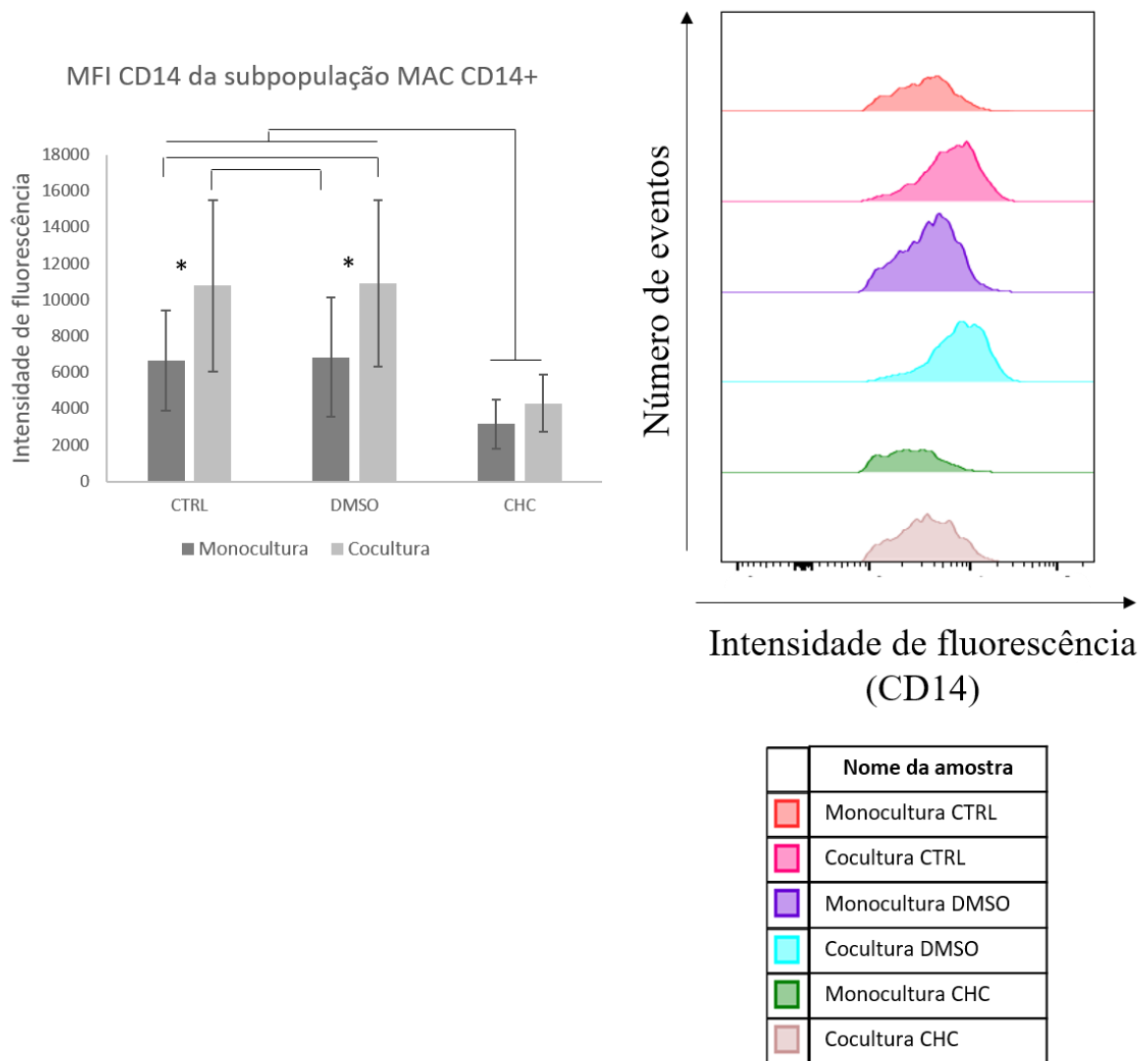


Figura 26. Expressão de CD14 na subpopulação MAC CD14+ da monocultura e cocultura.

A expressão da molécula CD14 pela subpopulação MAC CD14+ na monocultura e cocultura é representada de forma gráfica (esquerda) e em histograma (direita), para as condições controle (CTRL), controle de solvente (DMSO) e tratamento com 2 mM CHC (CHC). O gráfico da esquerda também ilustra os resultados da análise por ANOVA bidirecional, onde as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O símbolo * corresponde a diferença entre os pares (monocultura:cocultura), enquanto as barras indicam diferença entre as condições (CTRL, DMSO e CHC). Os dados são provenientes de cinco experimentos independentes.

MAC CD14+ = macrófagos CD14+.

4.4 O CHC diminui a expressão de HLA-DR e CD86 em macrófagos na monocultura em relação aos controles, porém, o efeito é perdido na cocultura.

Sabendo que o CHC causou alterações na expressão de CD14, nós também avaliamos os efeitos do tratamento sobre duas outras moléculas relacionadas ao fenótipo de macrófagos: HLA-DR e CD86. Para isso, analisamos a frequência e expressão dos marcadores na população de células vivas. Em relação as células da subpopulação MAC CD14+, o tratamento com CHC foi responsável por significativa menor frequência de células HLA-DR positivas na monocultura (CTRL: $98,74 \pm 1,47$; DMSO: $99,12 \pm 0,52$; CHC: $91,2 \pm 8,26$), porém, a frequência voltou a ser equivalente aos controles na cocultura (CTRL: $98,38 \pm 1,55$; DMSO: $98,6 \pm 1,13$; CHC: $93,7 \pm 4,44$) (**Figura 27A**). Quanto a expressão desta molécula, foi observado que o tratamento causou diminuição da expressão da mesma na monocultura, em relação aos controles (CTRL: 65677 ± 42718 ; DMSO: 54936 ± 34292 ; CHC: 18800 ± 14446). Porém, o cultivo de macrófagos com células tumorais não alterou a expressão de HLA-DR quando na presença de CHC, enquanto a cocultura causou a diminuição significativa da expressão desta molécula nos controles, que então perderam a diferença de expressão que possuíam com o tratamento (CTRL: 26275 ± 15621 ; DMSO: 29066 ± 20459 ; CHC: $13913 \pm 7563,2$) (**Figura 27B**). A **Figura 27C** resume os achados da frequência e expressão de HLA-DR nos macrófagos CD14+, mostrando que, apesar de o tratamento implicar em diferenças significativas na monocultura, a situação de cocultura com células tumorais revela que o CHC não causa diferenças significativas para HLA-DR em relação aos controles.

Já em relação a molécula CD86, o tratamento com CHC resultou em menor frequência de células positivas para este marcador, tanto na monocultura (CTRL: $98,92 \pm 0,85$; DMSO: $98,46 \pm 1,17$; CHC: $68,4 \pm 22,51$), quanto na cocultura (CTRL: $92,32 \pm 5,9$; DMSO: $93,22 \pm 4,15$; CHC: $66,9 \pm 16,54$) (**Figura 27D**). Quanto a expressão desta molécula, foi observado exatamente o mesmo efeito que ocorreu sobre a expressão de HLA-DR, descrito no parágrafo anterior (CTRL monocultura: 19829 ± 10916 ; DMSO monocultura: $18700 \pm 8110,4$; CHC monocultura: $6255,8 \pm 5566,8$; CTRL cocultura: $8049,4 \pm 3588,7$; DMSO cocultura: $8445,2 \pm 3283,8$; CHC cocultura: $4299,8 \pm 2550,8$) (**Figura 27E**). Sendo assim, apesar de o tratamento resultar em um número significativamente menor de macrófagos CD14+/CD86+, a expressão desta molécula por estas células não é modificada pelo tratamento na cocultura, em relação aos controles (**Figura 27F**).

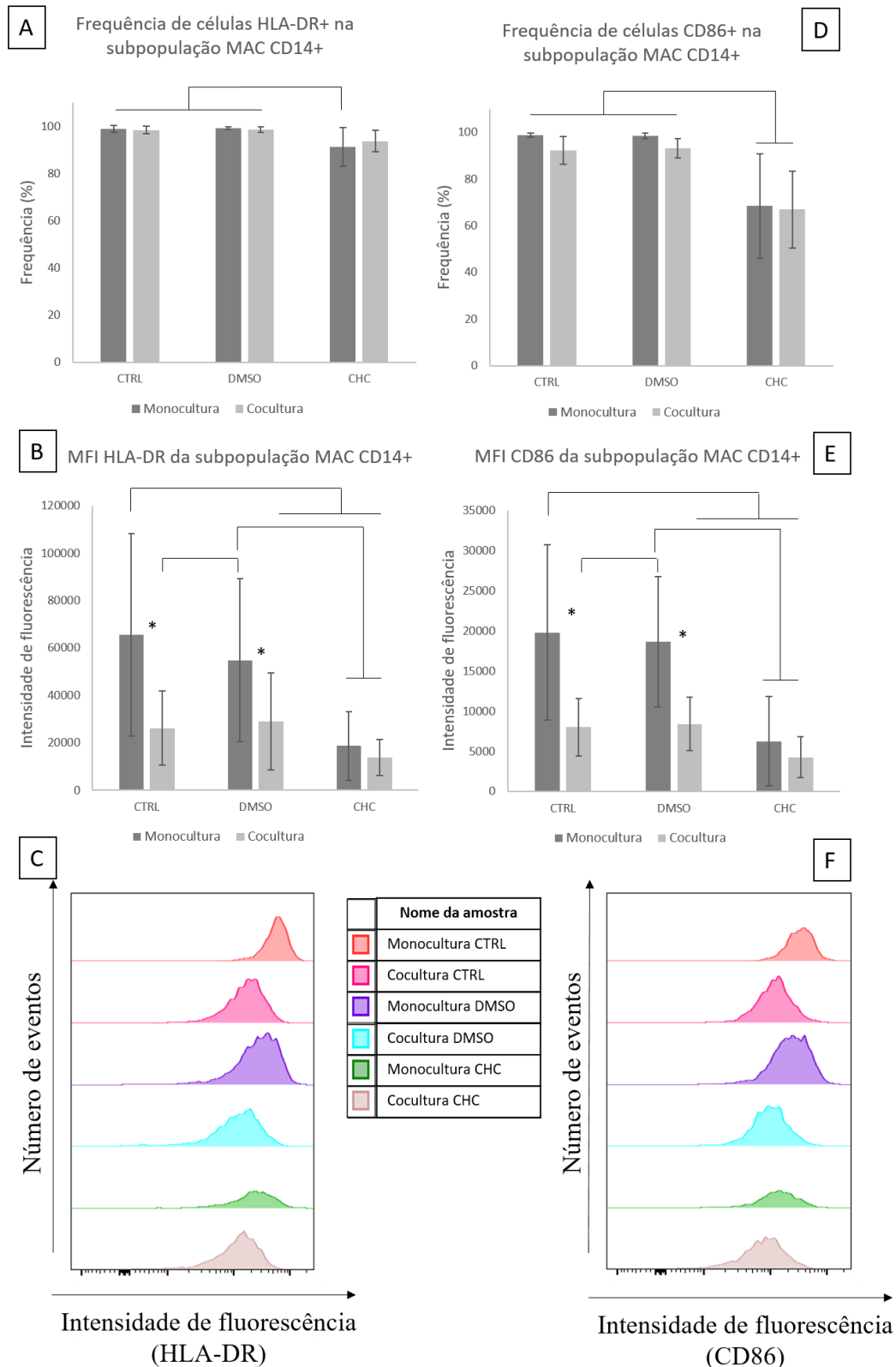


Figura 27. Frequência e expressão de HLA-DR e CD86 pela subpopulação MAC CD14+ da monocultura e cocultura.

A frequência e expressão das moléculas HLA-DR e CD86 por células da subpopulação MAC CD14+ da monocultura e cocultura é representada de forma gráfica (A, B, D e E) e em histograma (C e F), para as condições controle (CTRL), controle de solvente (DMSO) e tratamento com 2 mM CHC (CHC). (A) Frequência de macrófagos CD14+ HLA-DR+. (B) MFI da expressão de HLA-DR por macrófagos

CD14+. (C) Histograma da expressão de HLA-DR (MFI pelo número de eventos). (D) Frequência de macrófagos CD14+ CD86+. (E) MFI da expressão de CD86 por macrófagos CD14+. (F) Histograma da expressão de CD86 (MFI pelo número de eventos). Os dados foram analisados por ANOVA bidirecional, onde as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O símbolo * corresponde a diferença entre os pares (monocultura:cocultura), enquanto as barras indicam diferença entre as condições (CTRL, DMSO e CHC). Os dados são provenientes de cinco experimentos independentes.

MAC CD14+ = macrófagos CD14+.

Para poder determinar as células que são macrófagos na população de células CD45+/CD14- na cocultura, o marcador diferencial analisado é HLA-DR; portanto, todos os macrófagos CD14- são, obrigatoriamente neste trabalho, HLA-DR positivos e, por isso, a frequência de macrófagos CD14-/HLA-DR+ é de cem por cento em todas as condições (**Figura 28A**). Em relação a expressão desta molécula nos macrófagos CD14-, o mesmo fenômeno observado para os macrófagos CD14+ também é observado para estas células, como pode ser visualizado na **Figura 28B e C** e, sendo assim, a mesma conclusão pode ser assumida (CTRL monocultura: 40931 ± 21126 ; DMSO monocultura: 34307 ± 12026 ; CHC monocultura: $10288 \pm 5469,6$; CTRL cocultura: $10206 \pm 2575,6$; DMSO cocultura: $12521 \pm 3913,7$; CHC cocultura: $8143,4 \pm 2982,2$).

Já para a molécula CD86, a frequência de macrófagos CD14- que são CD86+ nas monoculturas controles é significativamente maior do que na monocultura tratada (CTRL: $92,5 \pm 3,97$; DMSO: $94,32 \pm 3,9$; CHC: $58,72 \pm 21,92$). Além disso, há indícios, que precisam ser melhor compreendidos, de que o cultivo com células tumorais, nas condições controles, causa diminuição da frequência de células positivas para este marcador, que passa a não ter mais diferença significativa de frequência com o tratamento (**Figura 28D**). Isto precisa ser melhor estudado pois, apesar de haver diminuição significativa da frequência na cocultura da condição controle de solvente (DMSO), a mesma diferença estatística não foi constatada no controle (CTRL). Apesar disso, diferente do que foi visto com os macrófagos CD14+, na cocultura tratada com CHC, a frequência de macrófagos CD14- que são CD86+ não é diferente das coculturas controles (CTRL: $75,94 \pm 8,84$; DMSO: $74,12 \pm 17,71$; CHC: $63,52 \pm 16,36$). Finalmente, a expressão de CD86 nos macrófagos CD14- segue padrão geral semelhante aos macrófagos CD14+, tendo o tratamento mais uma vez causado menor expressão da molécula na monocultura tratada (CTRL: $17903 \pm 9504,9$; DMSO: 25598 ± 14741 ; CHC: $2822,8 \pm 1989,9$), porém, na cocultura a expressão do marcador não é diferente entre as condições (CTRL: $7256,5 \pm 5861,4$; DMSO: $11403 \pm 7798,8$; CHC: $3259,8 \pm 1545,5$) (**Figura 28E e F**).

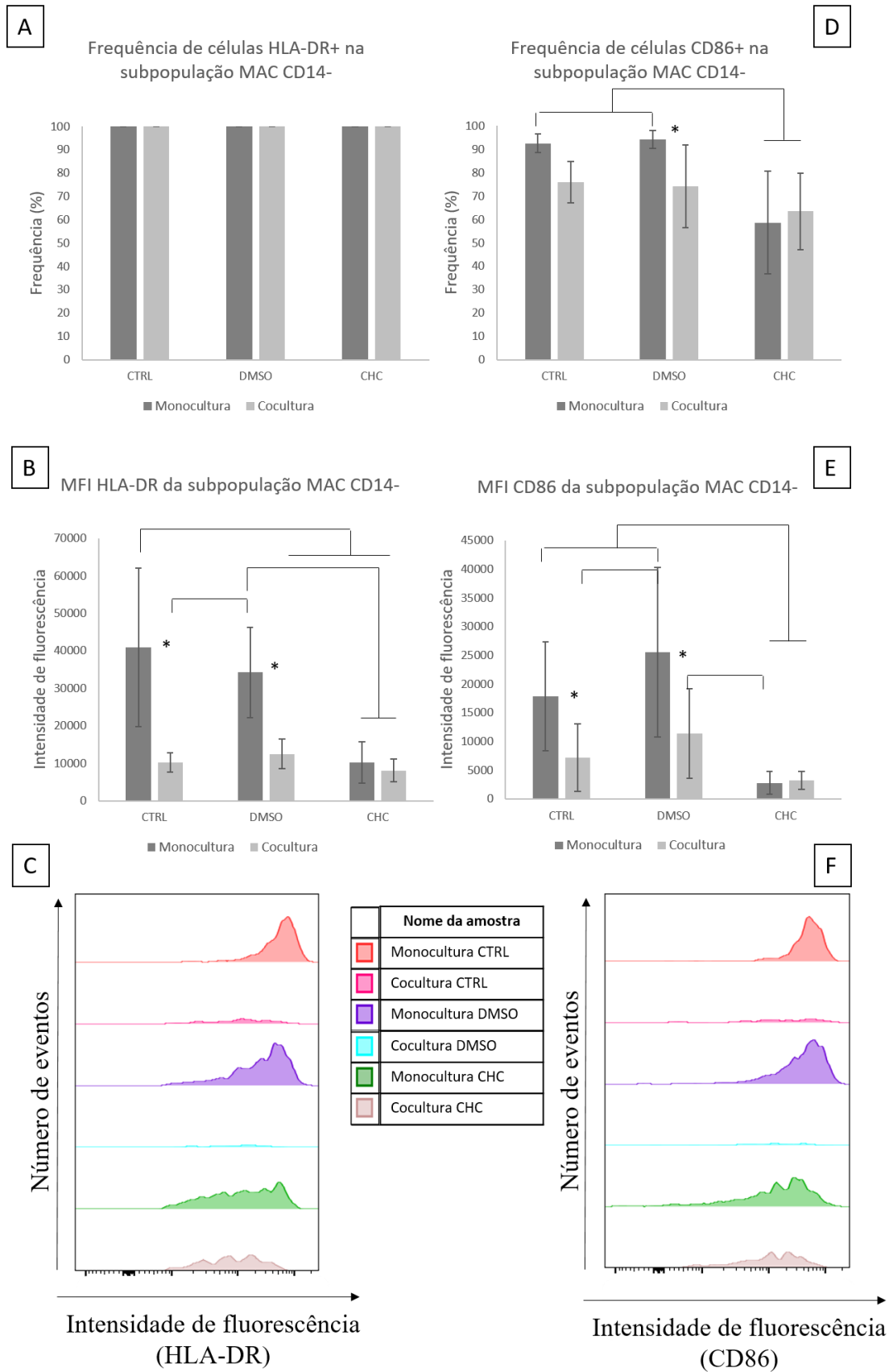


Figura 28. Frequência e expressão de HLA-DR e CD86 por células da subpopulação MAC CD14- da monocultura e cocultura.

A frequência e expressão das moléculas HLA-DR e CD86 pela subpopulação MAC CD14- da monocultura e cocultura é representada de forma gráfica (A, B, D e E) e em histograma (C e F), para as condições controle (CTRL), controle de solvente (DMSO) e tratamento com 2 mM CHC (CHC). (A) Frequência de macrófagos CD14- HLA-DR+, a qual corresponde a 100% para todas as condições, pois todos os macrófagos CD14- expressam HLA-DR. (B) MFI da expressão de HLA-DR por macrófagos CD14-. (C) Histograma da expressão de HLA-DR (MFI pelo número de eventos). (D) Frequência de macrófagos CD14- CD86+. (E) MFI da expressão de CD86 por macrófagos CD14-. (F) Histograma da expressão de CD86 (MFI pelo número de eventos). Os dados foram analisados por ANOVA bidirecional, onde as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O símbolo * corresponde a diferença entre os pares (monocultura:cocultura), enquanto as barras indicam diferença entre as condições (CTRL, DMSO e CHC). Os dados são provenientes de cinco experimentos independentes.

MAC CD14- = macrófagos CD14-.

4.5 O efeito do CHC só é significativo sobre células tumorais após seis dias de tratamento.

Para melhor compreender como o CHC causa o aumento da frequência de células tumorais mortas enquanto não resulta em diminuição da população de macrófagos, foram realizados mais três experimentos avaliando a cinética (em três e seis dias) dos efeitos do CHC – dentre estes efeitos, foi investigada a morte das células em cultura, utilizando o protocolo de marcação com Anexina V e 7AAD. Como foi observado em todos os experimentos que não há diferença entre os resultados provenientes do controle (CTRL) e do controle de solvente (DMSO), para efeito de simplicidade, nós mostraremos nos resultados da seção 4.5, 4.6 e 4.7 apenas os dados do controle de solvente (DMSO).

Nestes experimentos, não foi utilizado o anticorpo anti-HLA-DR e, portanto, não é possível discernir macrófagos e células tumorais na população CD45+/CD14- na cocultura da mesma maneira que nos experimentos anteriormente comentados e, portanto, para a cocultura, apenas as subpopulações MAC CD14+ e TUMOR CD45- foram analisadas, sendo necessários mais estudos para investigar a população CD45+/CD14- na cocultura, a qual corresponde as subpopulações MAC CD14- e TUMOR autofluorescente. De qualquer forma, com estes experimentos foi possível constatar que o tratamento continuou causando o aumento da frequência de células CD45+/CD14- na cocultura, um efeito significativo após três (DMSO: $4,73 \pm 1,2$; CHC: $17,07 \pm 1$) e seis (DMSO: $7,82 \pm 4,93$; CHC: $21,93 \pm 5,33$) dias da adição dos monócitos à cultura (**Figura 29**).

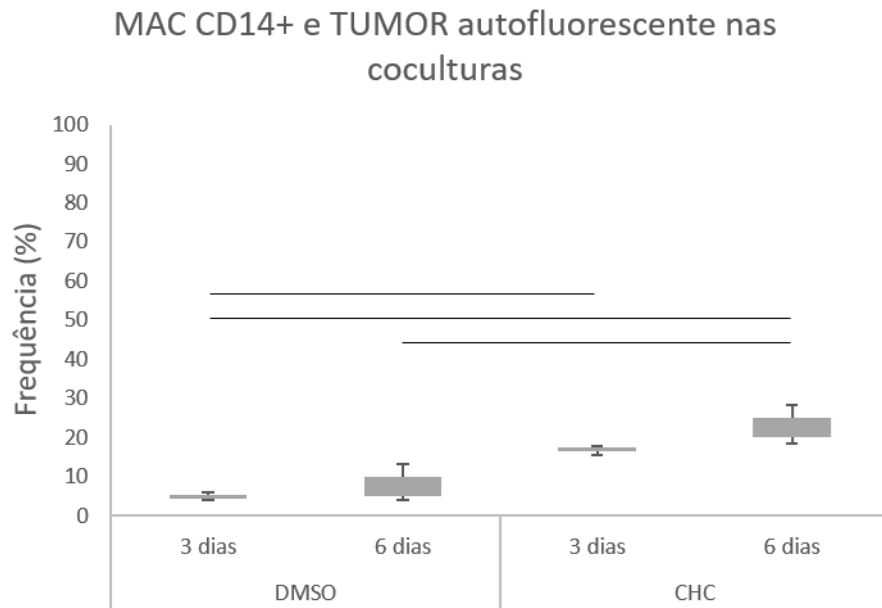


Figura 29. Frequência de células CD45+/CD14- (MAC CD14+ e TUMOR autofluorescente) na cocultura de células tumorais com macrófagos, em três e seis dias.

A frequência de células CD45+/CD14- (que correspondem a população MAC CD14+ e TUMOR autofluorescente) em três e seis dias é mostrada em gráfico, para as condições controle de solvente (DMSO) e tratamento com 2 mM de CHC (CHC). Resultados referentes aos experimentos com a linhagem tumoral SW756. As barras indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Dados provenientes de três experimentos independentes.

TUMOR autofluorescente = células tumorais autofluorescentes para AmCyam; MAC CD14- = macrófagos CD14-.

Nós analisamos na sequência os resultados referentes aos principais efeitos causados pelo CHC observados nos experimentos anteriores: as mudanças referentes a frequência de células tumorais vivas e a frequência das subpopulações de macrófagos. Para poder comparar a frequência da população tumoral na cocultura com o que foi observado nos experimentos anteriores, a frequência foi analisada descontando as células positivas para 7AAD, isto porque este corante funciona de forma semelhante ao DAPI, corando células que não tem integridade de membrana e, portanto, estão mortas. A subpopulação de células tumorais TUMOR CD45- que não se coraram com 7AAD é equivalente a população de células tumorais vivas dos experimentos anteriores, para as quais foi vista uma diminuição significativa de frequência com o tratamento, em relação aos controles (CTRL e DMSO) (**Figura 20B**). Nesta triplicata, é possível observar que não há diferença estatística na frequência destas células com o tratamento, em três (DMSO: $36,76 \pm 8,34$; CHC: $30,89 \pm 9,12$) e seis (DMSO: $52,32 \pm 9,05$; CHC: $39,71 \pm 16,69$) dias (**Figura 30A**); porém, é possível visualizar tendência de diminuição da frequência em seis dias de tratamento, em relação ao resultado do DMSO em seis dias. É possível que a

ausência de diminuição significativa seja decorrente do pequeno grupo amostral que, além do tamanho, também teve como desvantagem a variabilidade individual, pois para uma das doadoras avaliadas o tratamento não apresentou a mesma eficácia do que para as outras doadoras.

Na contrapartida, para poder comparar a análise da frequência de macrófagos CD14+ (MAC CD14+) nas coculturas desta triplicata com os experimentos feitos anteriormente, não foi necessário excluir as células mortas, já que naqueles experimentos a análise das subpopulações de macrófagos foi feita dentro da população total. De acordo com o que foi observado em experimentos anteriores, não houve diferença significativa da frequência de macrófagos CD14+ após três (DMSO: $52,47 \pm 9,83$; CHC: $46,87 \pm 11,81$) ou seis (DMSO: $35,27 \pm 12,68$; CHC: $32,33 \pm 12,24$) dias de tratamento com CHC, em relação ao DMSO, na cocultura (**Figura 30B**).

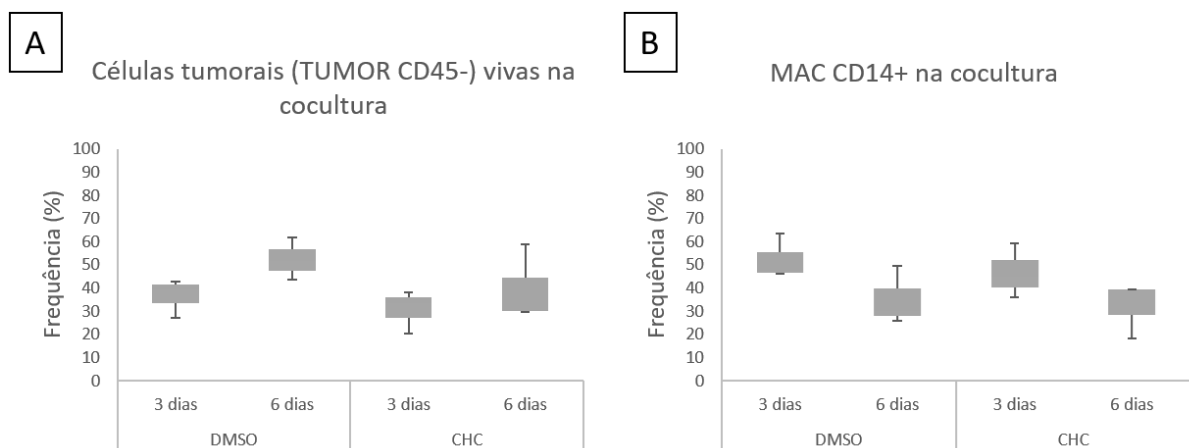


Figura 30. Frequência de células tumorais (TUMOR CD45-) vivas e MAC CD14+ nas coculturas, em três e seis dias.

A frequência de (A) células tumorais tumorais (TUMOR CD45-) vivas e (B) macrófagos CD14+ na cocultura, em três e seis dias, são mostradas em gráficos, para as duas condições comparadas nestes experimentos com as células tumorais da linhagem SW756: controle de solvente (DMSO) e tratamento com 2 mM de CHC (CHC). Não há diferença estatística entre os dados ($p < 0,05$). Resultados provenientes de três experimentos independentes.

TUMOR CD45- = células tumorais CD14-/CD45-; MAC CD14+ = macrófagos CD14+.

Nas monoculturas, é possível afirmar com certeza que a população de células CD45+/CD14- corresponde a subpopulação TUMOR autofluorescente na monocultura tumoral e a subpopulação MAC CD14- na monocultura de macrófagos e, portanto, a análise da frequência de células foi feita levando em consideração as células desta população. A análise

das células da monocultura tumoral mostra com mais clareza os indícios observados na cocultura. De fato, os efeitos sobre as células tumorais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) só são visualizados após seis dias de tratamento. Como pode ser observado na **Figura 31A**, a diminuição da frequência de células tumorais vivas na monocultura tratada não ocorre em três dias (DMSO: $78,53 \pm 7,18$; CHC: $78,70 \pm 5,13$), só sendo significativa em relação ao DMSO após seis dias do tratamento com CHC (DMSO: $78,87 \pm 8,73$; CHC: $65,20 \pm 8,57$). De mesma forma, o aumento da frequência de células tumorais mortas também não ocorre após três dias de tratamento com o CHC (DMSO: $21,47 \pm 7,18$; CHC: $21,30 \pm 5,13$), mas é significativo após seis dias (DMSO: $21,13 \pm 8,73$; CHC: $34,80 \pm 8,57$) (**Figura 31B**).

Já para os monócitos/macrófagos da monocultura, não foram observadas diferenças significativas que indicassem diminuição da frequência de macrófagos CD14+ (**Figura 31C**) ou aumento da frequência de macrófagos CD14- (**Figura 31D**) na monocultura tratada em relação a monocultura da condição DMSO em três dias (MAC CD14+ DMSO: $78,40 \pm 9,42$; MAC CD14+ CHC: $50,53 \pm 18,54$; MAC CD14- DMSO: $11,93 \pm 9,01$; MAC CD14- CHC: $38,10 \pm 21,77$) ou em seis dias (MAC CD14+ DMSO: $70,77 \pm 16,46$; MAC CD14+ CHC: $35,27 \pm 6,49$; MAC CD14- DMSO: $15,18 \pm 7,14$; MAC CD14- CHC: $40,97 \pm 12,98$). A única diferença estatística existente é a diminuição significativa da frequência de macrófagos CD14+ após seis dias de tratamento em relação a frequência destas células na condição DMSO em três dias. Apesar da ausência de mais diferenças estatísticas, visualmente é possível notar tendência de diminuição da frequência de macrófagos CD14+ e de aumento de macrófagos CD14- já em três dias após o tratamento, indicando que, possivelmente, neste período o tratamento já começou a causar alterações na população de macrófagos, porém, é necessária repetição destes experimentos com um grupo amostral maior para poder confirmar esta hipótese.

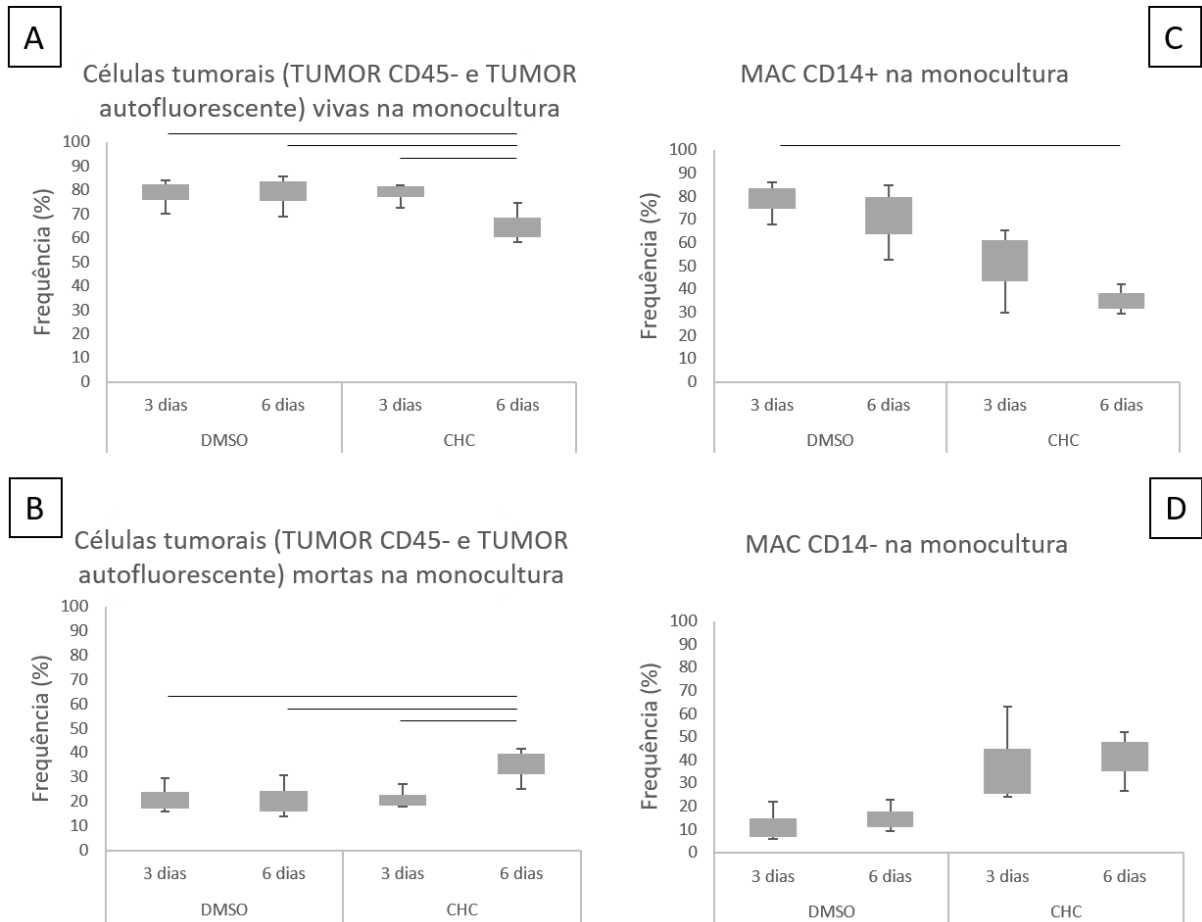


Figura 31. Frequência de células tumorais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) vivas e mortas e frequência das subpopulações de macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-) nas monoculturas, em três e seis dias.

As frequências de células tumorais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) da linhagem SW756 vivas e mortas, e as frequências das subpopulações de macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-) são mostradas em gráficos, para as duas condições analisadas nestes experimentos: controle de solvente (DMSO) e tratamento com 2 mM de CHC (CHC). (A) Frequência de células tumorais vivas na monocultura tumoral. (B) Frequência de células tumorais mortas na monocultura tumoral. (C) Frequência de macrófagos CD14+ na monocultura de macrófagos. (D) Frequência de macrófagos CD14- na monocultura de macrófagos. As barras indicam diferença estatística entre as condições ($p < 0,05$). Dados provenientes de três experimentos independentes.

TUMOR CD45- = células tumorais CD14-/CD45-; TUMOR autofluorescente = células tumorais autofluorescentes para AmCyan; MAC CD14+ = macrófagos CD14+; MAC CD14- = macrófagos CD14-.

4.6 Análise da marcação por Anexina V e 7AAD em macrófagos e células tumorais.

A análise da marcação por Anexina V e 7AAD seguiu o mesmo racional descrito no item 4.5, ou seja, na cocultura a marcação foi analisada nas células da subpopulação TUMOR CD45- e na subpopulação MAC CD14+, enquanto na monocultura foi possível analisar a marcação em

toda a população de células tumorais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) e macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-). Em relação as células tumorais TUMOR CD45- na cocultura, não foram observadas diferenças significativas entre as condições avaliadas (**Tabela 8 e Figura 32**). Isto era esperado, já que foi observado nos experimentos anteriores que as células tumorais que morrem se tornam autofluorescentes para AmCyan e, portanto, passam a pertencer a subpopulação TUMOR autofluorescente. Desta forma, estes dados não correspondem a todas as células tumorais mortas e mais experimentos utilizando o anticorpo HLA-DR se fazem necessários para investigar a cinética do aparecimento das células “TUMOR autofluorescentes” na cocultura. De qualquer forma, este experimento permitiu a observação de que, em relação a apoptose inicial, o tratamento não causa diferenças em relação ao DMSO, em três e seis dias (**Figura 32B**).

Tabela 8. Médias e desvios padrões das frequências (%) de células da subpopulação TUMOR CD45- vivas, em apoptose e mortas na cocultura.

Valores calculados a partir de três experimentos independentes.

Amostra	Tempo	Viabilidade	DMSO	CHC
Células tumorais TUMOR CD45- (Cocultura)	Três dias	Vivas	71,23 ± 1,3	68,27 ± 10,12
		Em apoptose	16,53 ± 1,81	20,87 ± 8,98
		Mortas	6,31 ± 0,79	7,13 ± 2,22
	Seis dias	Vivas	82,7 ± 3,9	76,03 ± 5,54
		Em apoptose	11,58 ± 3,29	14,83 ± 6,40
		Mortas	4,52 ± 1,88	6,54 ± 1,52

TUMOR CD45- = células tumorais CD14-/CD45-.

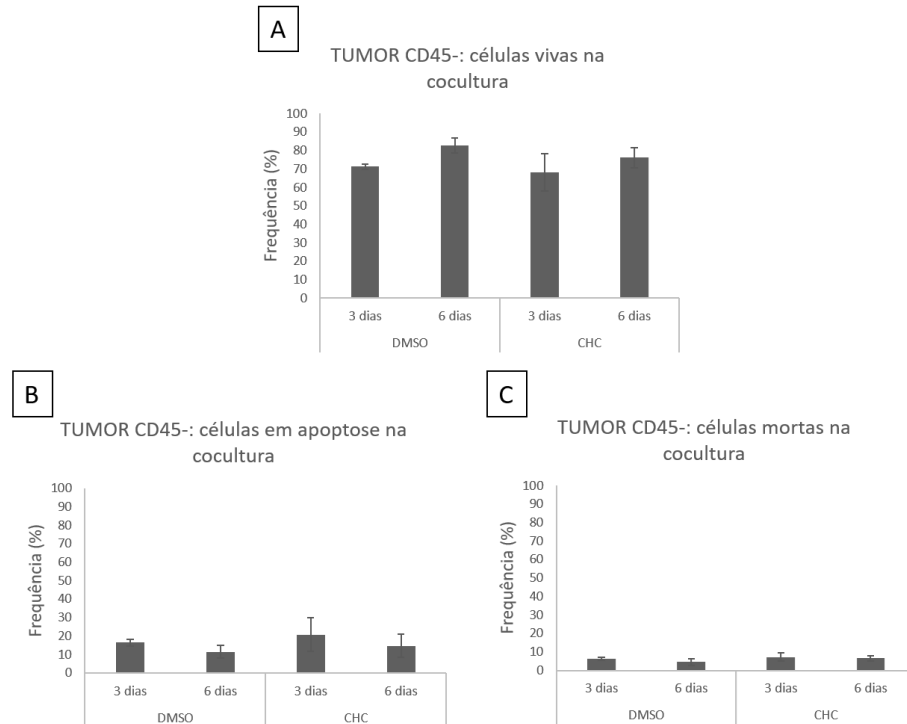


Figura 32. Frequência de células tumorais TUMOR CD45- vivas, em apoptose ou mortas na cocultura, em três e seis dias.

As frequências de células tumorais da subpopulação TUMOR CD45- vivas (A), em apoptose inicial (B) e mortas (C) na cocultura são apresentadas nos gráficos, onde são mostrados os dados de três e seis dias, comparando as condições controle de solvente (DMSO) e tratamento com 2 mM CHC (CHC). Não há diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Dados provenientes de três experimentos independentes com a linhagem tumoral SW756.

TUMOR CD45- = células tumorais CD14-/CD45-.

Ainda em relação às células tumorais, na monocultura (**Tabela 9**) foi possível analisar a marcação por Anexina V e 7AAD em todas as células tumorais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) e, portanto, seria esperado ver diminuição da frequência de células vivas e aumento da frequência de células mortas após seis dias de tratamento com CHC. Como pode ser observado na **Figura 33**, apesar de ser possível notar tendência de diminuição da frequência de células vivas (**Figura 33A**) e de aumento da frequência de células mortas (**Figura 33C**) seis dias após o tratamento com CHC, esse resultado não apresentou significância estatística em relação ao DMSO. Em três dias, esta tendência não é observada e, portanto, estes dados corroboram com a hipótese levantada de que o tratamento mostra resultados sobre as células tumorais após seis dias de tratamento, e não em três. Nós acreditamos que o número pequeno de amostras nesses experimentos seja o responsável pela ausência de significância e, desta forma, mais experimentos são necessários para confirmar o efeito em seis dias. Por fim, assim

como visto na cocultura, não existe aparente diferença entre a frequência de apoptose com o tratamento, em três ou seis dias (**Figura 33B**).

Tabela 9. Médias e desvios padrões das frequências (%) de células tumorais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) vivas, em apoptose e mortas na monocultura.

Valores calculados a partir de três experimentos independentes.

Amostra	Tempo	Viabilidade	DMSO	CHC
Células tumorais (Monocultura)	Três dias	Vivas	51,27 ± 15,82	53,37 ± 7,58
		Em apoptose	27,27 ± 8,64	25,33 ± 3,24
		Mortas	18,73 ± 7,52	17,93 ± 5,04
	Seis dias	Vivas	61,1 ± 8,16	46,23 ± 3,20
		Em apoptose	17,77 ± 7,37	18,97 ± 10,60
		Mortas	18,93 ± 8,46	31,57 ± 6,25

TUMOR CD45- = células tumorais CD14-/CD45-; TUMOR autofluorescente = células tumorais autofluorescentes para AmCyam.

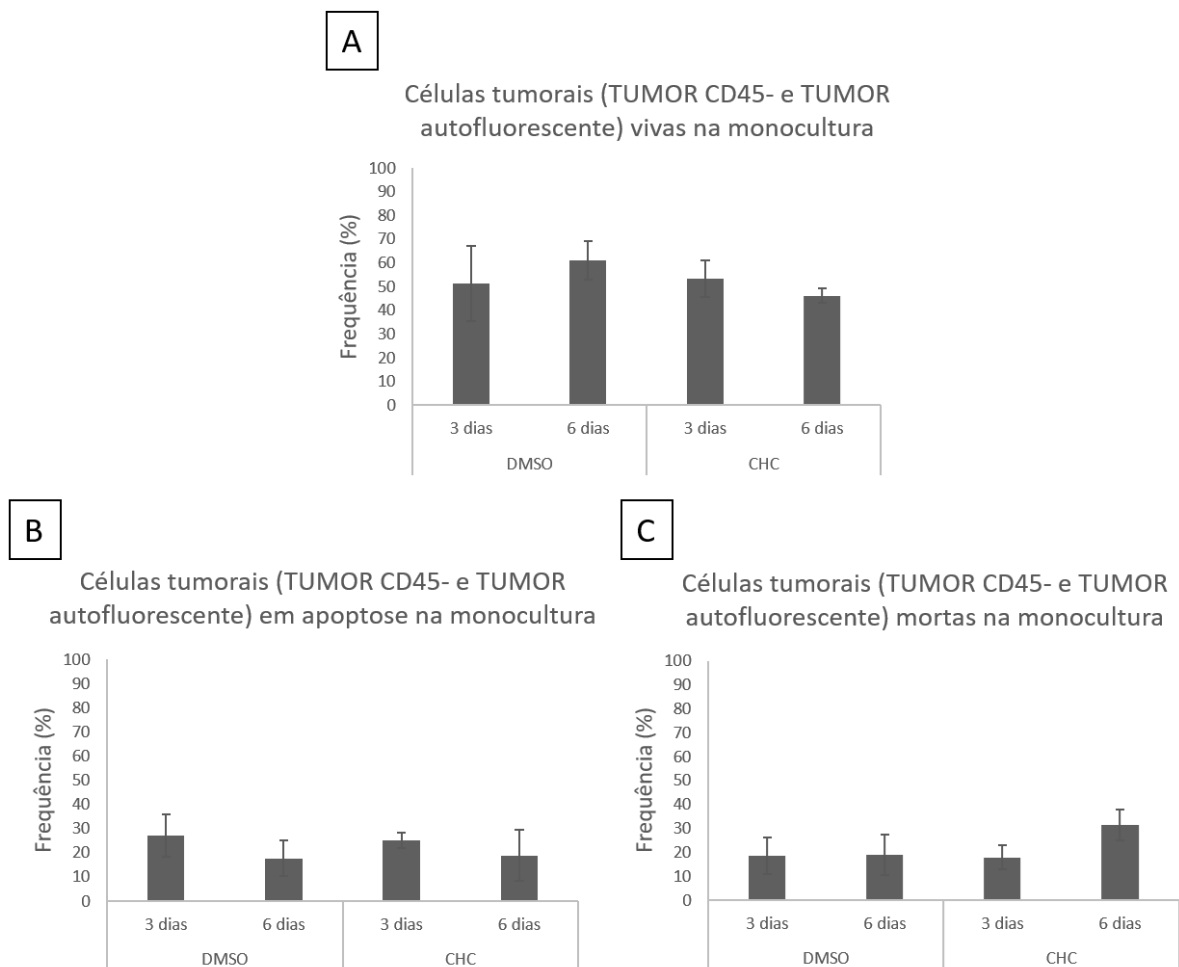


Figura 33. Frequência de células tumorais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) vivas, em apoptose e mortas na monocultura, em três e seis dias.

As frequências de células tumorais (TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) vivas (A), em apoptose (B) e mortas (C) na monocultura são apresentadas nos gráficos que mostram os dados de três e seis dias, comparando as condições controle de solvente (DMSO) e tratamento com 2 mM CHC (CHC). Não há diferença significativa entre as condições ($p < 0,05$). Dados provenientes de três experimentos independentes com a linhagem tumoral SW756.

TUMOR CD45- = células tumorais CD14-/CD45-; TUMOR autofluorescente = células tumorais autofluorescentes para AmCyam.

Diferente do que causou em células tumorais, o tratamento com CHC não provocou a diminuição da frequência de macrófagos viáveis após três ou seis dias de tratamento. Na cocultura (**Tabela 10 e Figura 34**), é possível observar uma pequena tendência de aumento da frequência de macrófagos CD14+ vivos em três dias, a qual se torna significativamente relevante após seis dias do tratamento com CHC, em relação ao DMSO (**Figura 34A**). O reflexo deste aumento da viabilidade pode ser observado na **Figura 34C**, onde também é possível ver tendência de diminuição de células mortas após três dias de tratamento com CHC, a qual se torna estatisticamente significativa após seis dias. Novamente, em relação a apoptose (**Figura 34B**) nenhuma alteração relevante foi observada. Em conjunto, estes dados mostram que o CHC demonstra efeitos significativos sobre os macrófagos após seis do tratamento.

Tabela 10. Médias e desvios padrões das frequências (%) das células da população MAC CD14+ vivas, em apoptose e mortas na cocultura.

Valores calculados a partir de três experimentos independentes.

Amostra	Tempo	Viabilidade	DMSO	CHC
Macrófagos CD14+ (Cocultura)	Três dias	Vivas	52,27 ± 13,72	68,43 ± 8,35
		Em apoptose	20,93 ± 0,71	20,07 ± 9,18
		Mortas	20,30 ± 12,08	7,72 ± 4,16
	Seis dias	Vivas	24,57 ± 5,68	59,10 ± 9,54
		Em apoptose	21,77 ± 21,61	17,23 ± 11,13
		Mortas	39,50 ± 9,61	18,33 ± 2,72

MAC CD14+ = macrófagos CD14+.

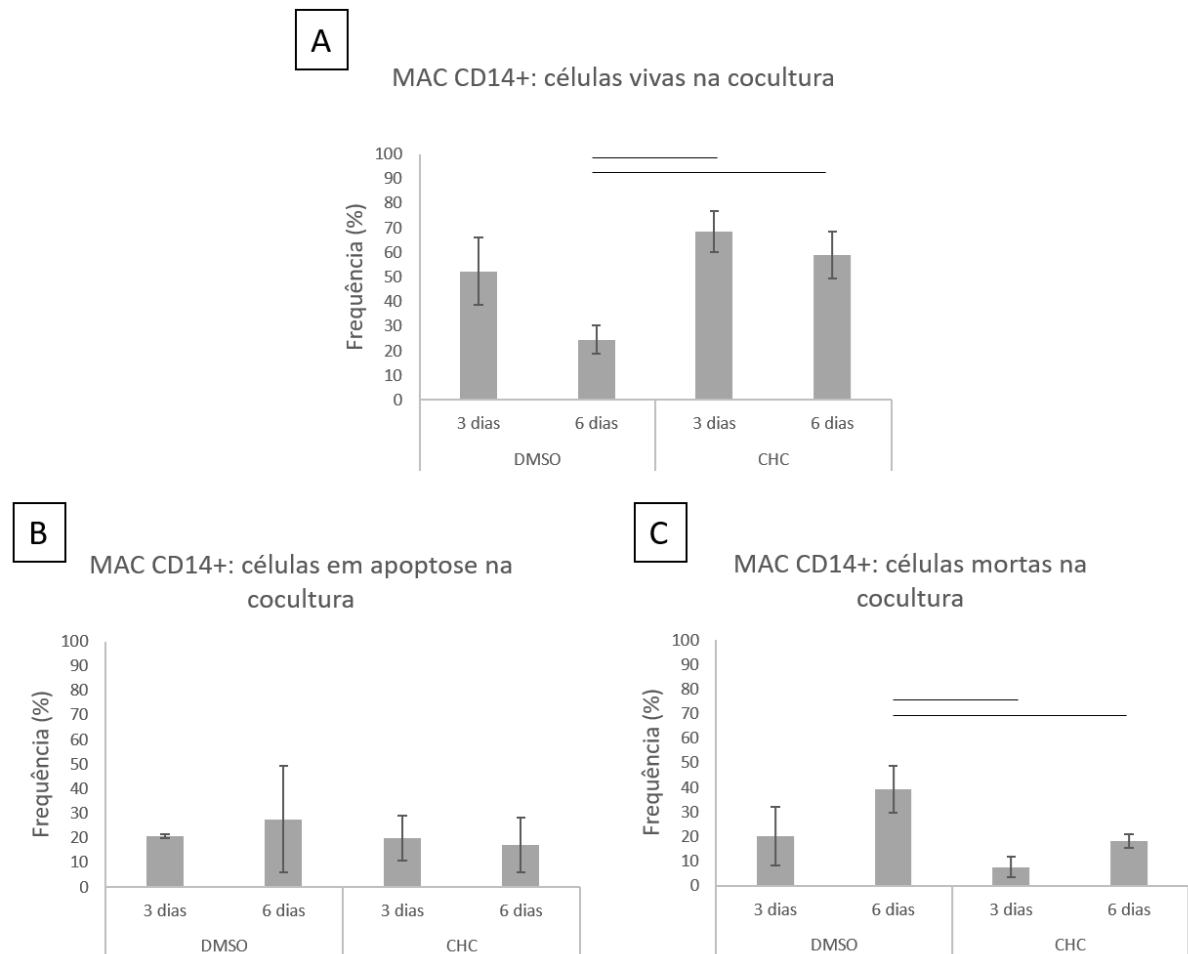


Figura 34. Frequência de macrófagos CD14+ vivos, em apoptose e mortos na cocultura, em três e seis dias.

As frequências de macrófagos CD14+ vivos (A), em apoptose (B) e mortos (C) na cocultura são apresentadas nos gráficos, onde são mostrados os dados de três e seis dias, comparando as condições controle de solvente (DMSO) e tratamento com 2 mM CHC (CHC). As barras indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Dados provenientes de três experimentos independentes com a linhagem tumoral SW756.

MAC CD14+ = macrófagos CD14+.

Em relação a monocultura de macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-) (**Tabela 11** e **Figura 35**), é possível observar uma tendência de aumento da frequência de células vivas (**Figura 35A**) e diminuição da frequência de células mortas (**Figura 35C**) em três e seis dias após o tratamento com CHC, porém, esta tendência não se mostrou significativa. O único efeito com significância estatística é o aumento da frequência de células mortas que ocorre após seis dias de cultura em relação a três dias de cultura, para ambas as condições (DMSO e CHC) o que mostra que os macrófagos vão morrendo ao longo dos seis dias de monocultura. Ao analisar a marcação por Anexina V e 7AAD separando as subpopulações de macrófagos CD14+ e CD14-, um padrão muito semelhante de distribuição dos dados e diferenças estatísticas é

visualizado, confirmando que os resultados observados, referentes a monocultura de macrófagos, não são influenciados mais por um subtipo ou outro de macrófagos (resultados não mostrados). Em conclusão, mais experimentos são necessários para confirmar se a ausência de diferença significativa em relação à viabilidade neste caso é ou não resultado do pequeno grupo amostral ou se o aumento da viabilidade com o tratamento só ocorre caso as células tumorais estejam presentes.

Tabela 11. Médias e desvios padrões das frequências (%) de macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-) vivos, em apoptose e mortos nas monoculturas.

Valores calculados a partir de três experimentos independentes.

Amostra	Tempo	Viabilidade	DMSO	CHC
Macrófagos (Monocultura)	Três dias	Vivas	47,27 ± 12,11	65,77 ± 18,16
		Em apoptose	26,43 ± 10,87	27,17 ± 17,09
		Mortas	20,67 ± 4,33	4,78 ± 1,49
	Seis dias	Vivas	28,43 ± 5,52	49,93 ± 8,24
		Em apoptose	16,88 ± 11,82	14,7 ± 2,43
		Mortas	48,7 ± 12,62	32,5 ± 8,30

MAC CD14+ = macrófagos CD14+; MAC CD14- = macrófagos CD14-.

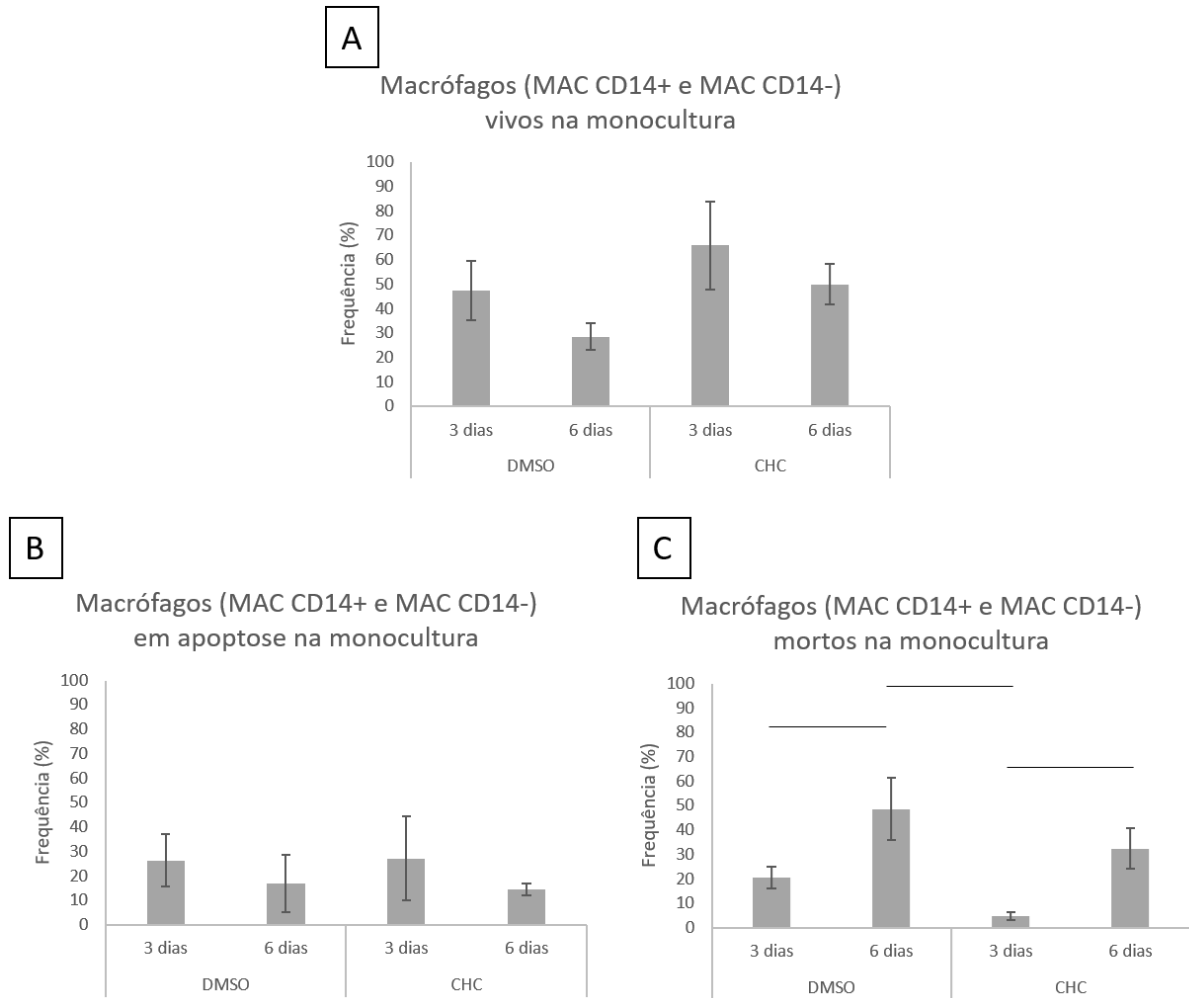


Figura 35. Frequência de macrófagos (MAC CD14+ e MAC CD14-) vivos, em apoptose e mortos na monocultura, em três e seis dias.

As frequências de macrófagos (que correspondem ao conjunto das populações MAC CD14+ e MAC CD14-) vivos (A), em apoptose (B) e mortos (C) na monocultura são apresentadas nos gráficos, onde são mostrados os dados de três e seis dias, comparando as condições controle de solvente (DMSO) e tratamento com 2 mM CHC (CHC). As barras mostram a existência de diferença significativa entre as condições ($p < 0,05$). Dados provenientes de três experimentos independentes.

MAC CD14+ = macrófagos CD14+; MAC CD14- = macrófagos CD14-.

4.7 O tratamento de coculturas e monoculturas de células tumorais e macrófagos com 50 nM AZD3965 não apresenta o mesmo resultado do tratamento com 2 mM CHC.

Após a observação dos efeitos antitumorais do CHC, além de investigarmos as alterações de morte celular desencadeadas pelo mesmo, nós também buscamos compreender melhor o mecanismo envolvido para desencadear estes efeitos. Por isso, além da análise da cinética de marcação por Anexina V e 7AAD, a última triplicata de experimentos com a linhagem SW756

também envolveu a inclusão de monoculturas e coculturas tratadas com AZD 3965 na dose de 50 nM (AZD), analisadas após seis dias do tratamento. Além disso, quantificamos a concentração de lactato em sobrenadantes destas culturas, para verificar se os efeitos observados possuem relação com a inibição do transporte desta molécula. Como comentado no item 4.5, nesses experimentos não foi utilizado o anticorpo anti-HLA-DR e, portanto, a análise foi conduzida da mesma forma que nos dois itens anteriores (4.5 e 4.6). Além disso, para efeito de simplicidade, continuaremos mostrando como controle apenas o grupo controle de solvente (DMSO)

Primeiramente, em relação a cocultura, foi observado que o AZD, diferente do CHC, não causou o aumento da frequência de células CD45+/CD14- (que correspondem as subpopulações MAC CD14- e TUMOR autofluorescente), não possuindo diferença estatística com o DMSO (DMSO: $7,82 \pm 4,93$; AZD: $10,13 \pm 8,13$; CHC: $21,93 \pm 5,33$) (**Figura 36A**). Em relação as células tumorais da subpopulação TUMOR CD45- vivas, previamente havia sido observada uma tendência de diminuição da frequência das mesmas com o tratamento com CHC, tendência esta que não foi observada com o tratamento com AZD (DMSO: $52,32 \pm 9,05$; AZD: $51,01 \pm 10,94$; CHC: $39,71 \pm 16,69$) (**Figura 36B**). Por fim, como esperado, nenhuma diferença estatística foi observada em relação a subpopulação MAC CD14+ na cocultura (**Figura 36C**), nem mesmo com o CHC (DMSO: $35,27 \pm 12,68$; AZD: $32,37 \pm 6,37$; CHC: $32,33 \pm 12,24$). Sendo assim, estes primeiros dados indicam que o AZD nesta dose não está exercendo o mesmo efeito que o CHC.

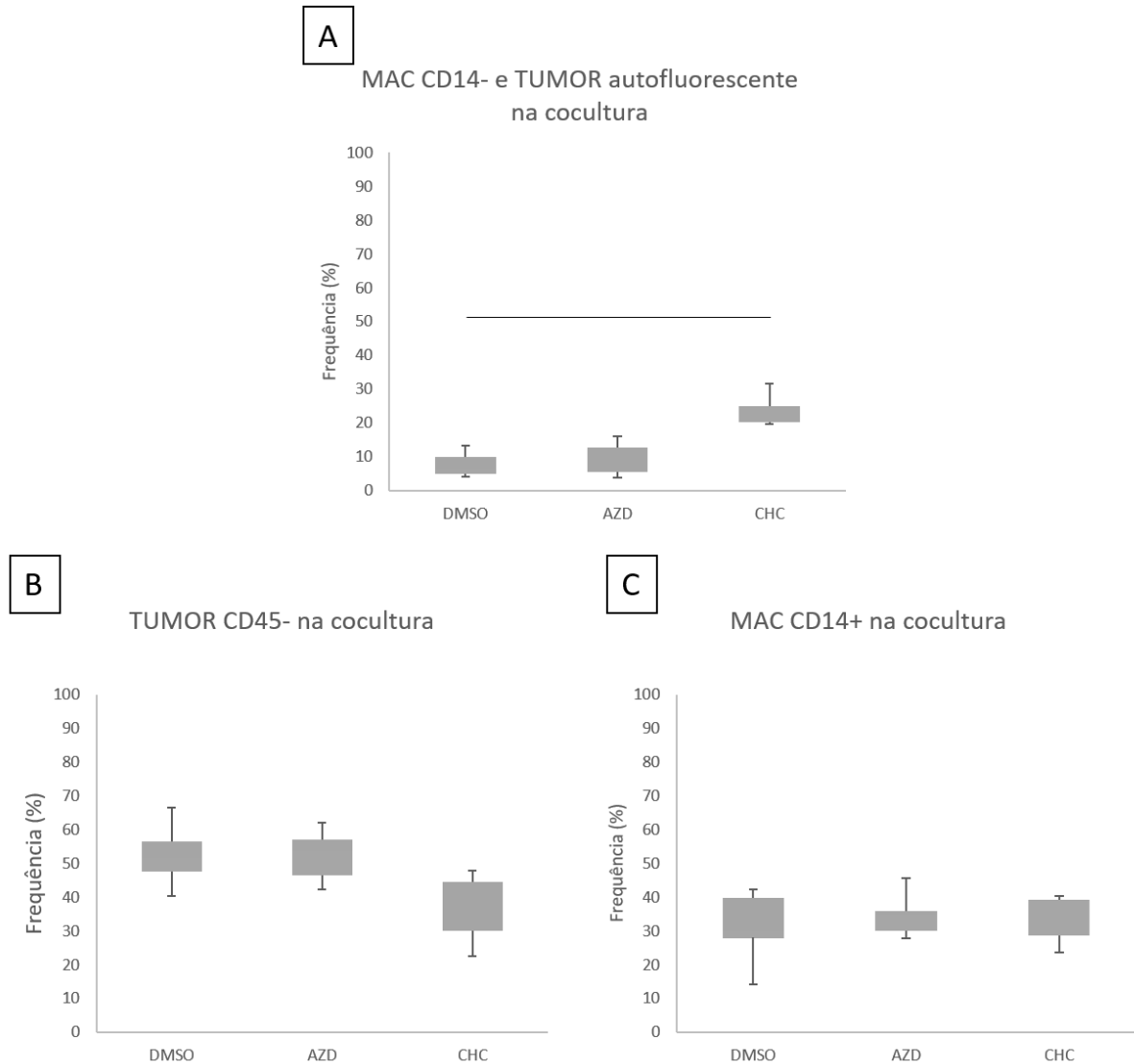


Figura 36. Frequência das subpopulações de células nas coculturas de células tumorais com macrófagos após os diferentes tratamentos.

As frequências das subpopulações de células nas coculturas de células tumorais da linhagem SW756 com macrófagos de doadores saudáveis são mostradas nos gráficos, para as três condições avaliadas: controle de solvente (DMSO), tratamento com 50 nM AZD 3965 (AZD) e tratamento com 2 mM de CHC (CHC). (A) Frequência de células das populações MAC CD14- e TUMOR autofluorescente na cocultura. (B) Frequência de células tumorais TUMOR CD45- na cocultura. (C) Frequência de macrófagos CD14+ na cocultura. As barras indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Dados provenientes de três experimentos independentes.

TUMOR CD45- = células tumorais CD14-/CD45-; TUMOR autofluorescente = células tumorais autofluorescentes para AmCyam; MAC CD14+ = macrófagos CD14+; MAC CD14- = macrófagos CD14-.

Em concordância com o que os dados acima indicam, na monocultura também foi constatado que o AZD na dose de 50 nM não exerce os mesmos efeitos do CHC. Novamente, na monocultura tumoral, foi avaliado o total destas células (juntando TUMOR CD45- e

TUMOR autofluorescente). Como pode ser observado na **Figura 37**, o CHC causou diminuição da frequência de células tumorais vivas (DMSO: $78,87 \pm 8,73$; AZD: $75,20 \pm 4,75$; CHC: $65,30 \pm 8,53$) (**Figura 37A**) e aumento da frequência de células tumorais mortas (DMSO: $21,13 \pm 8,73$; AZD: $24,80 \pm 4,75$; CHC: $34,70 \pm 8,53$) (**Figura 37B**) em relação aos controle de solvente (DMSO) e também em comparação ao AZD, que não apresentou diferença alguma com o DMSO. De forma semelhante, o CHC também causou diminuição significativa da frequência de macrófagos CD14+ em relação ao DMSO e ao AZD, que também se mostrou equivalente aos controles neste parâmetro (DMSO: $70,77 \pm 16,46$; AZD: $71,93 \pm 12,81$; CHC: $35,27 \pm 6,49$) (**Figura 37C**). Por fim, apesar de ausência de significância estatística, o CHC mostrou tendência em aumentar a frequência de macrófagos CD14-, o que não foi observado para o AZD (DMSO: $15,18 \pm 7,14$; AZD: $16,67 \pm 10,68$; CHC: $40,97 \pm 12,98$) (**Figura 37D**).

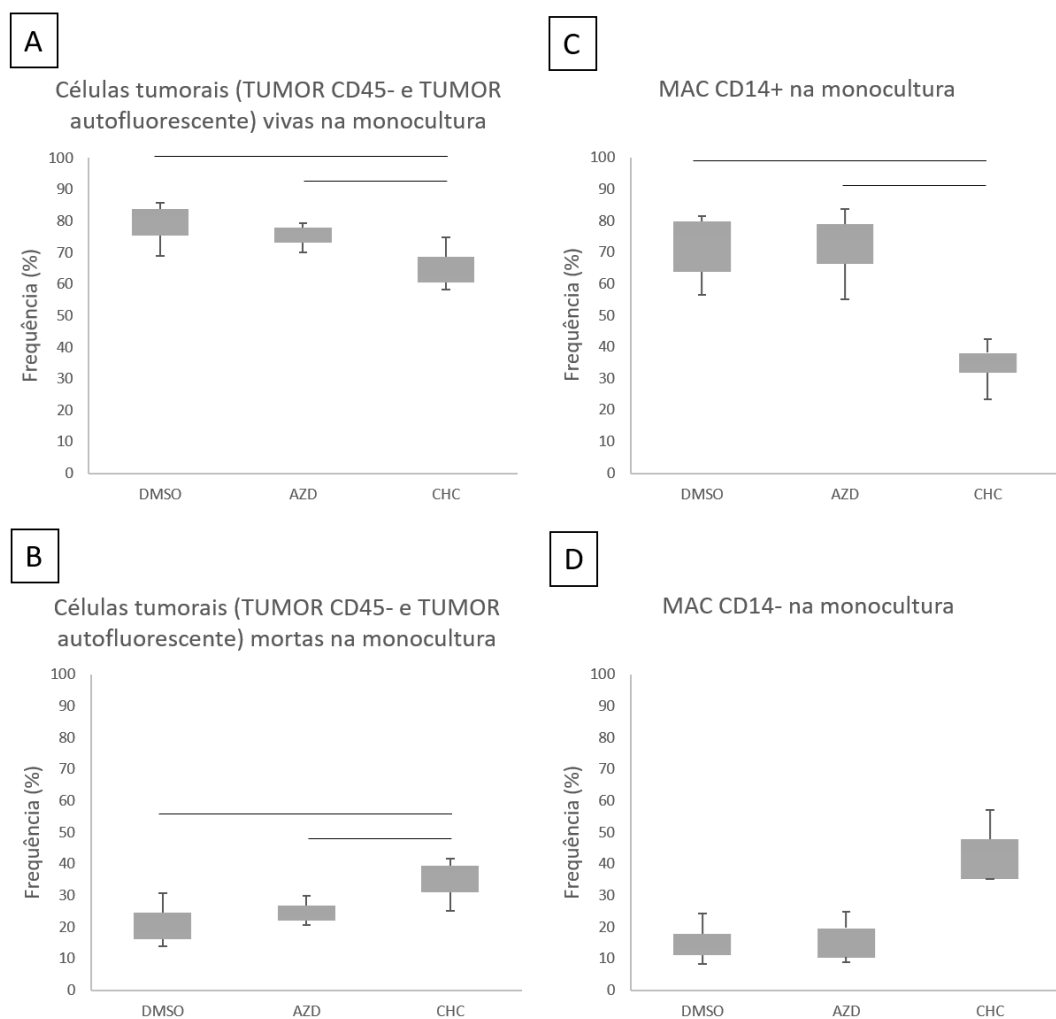


Figura 37. Frequência das subpopulações de células nas monoculturas de células tumorais e macrófagos após os diferentes tratamentos.

As frequências de células vivas e mortas nas monoculturas de células tumorais (contabilizando as subpopulações TUMOR CD45- e TUMOR autofluorescente) da linhagem SW756 e as frequências das subpopulações MAC CD14+ e MAC CD14- nas monoculturas de macrófagos de doadores saudáveis são mostradas nos gráficos, para as três condições avaliadas: controle de solvente (DMSO), tratamento com 50 nM AZD 3965 (AZD) e tratamento com 2 mM de CHC (CHC). (A) Frequência de células tumorais vivas na monocultura. (B) Frequência de células tumorais mortas. (C) Frequência de macrófagos MAC CD14+ na monocultura. (D) Frequência de macrófagos MAC CD14- na monocultura. As barras indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Dados provenientes de três experimentos independentes.

TUMOR CD45- = células tumorais CD14-/CD45-; TUMOR autofluorescente = células tumorais autofluorescentes para AmCyan; MAC CD14+ = macrófagos CD14+; MAC CD14- = macrófagos CD14-.

Para melhor compreender os efeitos causados pela dose de 2 mM CHC, e suas diferenças com a dose de 50 nM de AZD, a concentração de lactato extracelular, presente nos sobrenadantes das culturas, foi quantificada. Primeiramente, foi quantificado o lactato extracelular de três experimentos diferentes (triplicata biológica), avaliando os efeitos do tratamento com CHC. Além da triplicata biológica, também foram feitas triplicatas experimentais, na tentativa de obter dados mais homogêneos. Mesmo assim, como pode ser observado principalmente pela ampla distribuição das barras de cada condição da monocultura de células tumorais (**Figura 38B**), a variabilidade da concentração extracelular de lactato em culturas é grande. Apesar disso, os resultados sugerem que o efeito do CHC tem relação com o transporte de lactato; como pode ser observado na **Figura 38B**, o grupo de sobrenadantes de amostras das monoculturas tumorais tratadas com CHC foi o único que mostrou diferença significativamente estatística com os sobrenadantes de células tumorais em cultura de quatro dias (onde os sobrenadantes foram coletados logo antes da adição dos monócitos), enquanto o DMSO não apresentou esta mesma diferença (DMSO: $28,77 \pm 8,80$; CHC: $33,81 \pm 4,70$; TU 4 dias: $17,94 \pm 2,59$). Além disso, os sobrenadantes de macrófagos da monocultura tratados mostraram possuir quantidade significativamente maior de lactato do que o controle de solvente DMSO (DMSO: $15,38 \pm 2,55$; CHC: $17,99 \pm 2,93$) (**Figura 38C**). Apesar de não haver diferença na cocultura (DMSO: $47,21 \pm 6,65$; CHC: $47,42 \pm 2,46$) (**Figura 38A**), estes achados demonstram que, mesmo não sendo detectável na cocultura, esta dose de CHC interfere com o transporte de lactato. Além disso, apesar de parecerem possivelmente pequenas, estas diferenças são relevantes, já que aproximadamente $10,71 \pm 2,18$ do lactato extracelular corresponde ao lactato presente no meio de cultura.

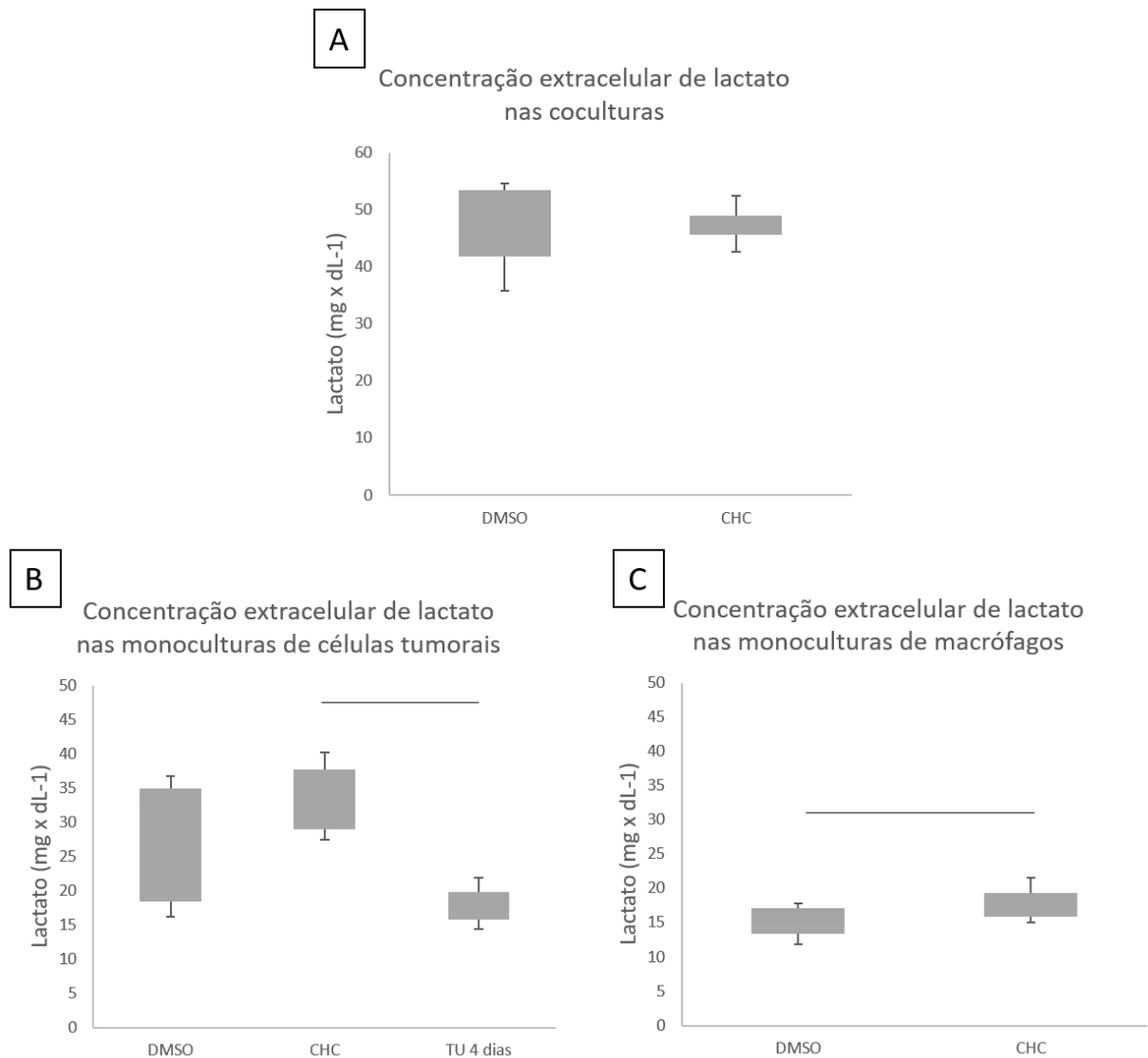


Figura 38. Concentrações extracelulares de lactato nas monoculturas e coculturas, nas condições controle de solvente (DMSO) e tratadas com CHC.

As concentrações extracelulares de lactato, quantificadas a partir dos sobrenadantes das culturas, são mostradas nos gráficos em miligramas por decilitro, comparando as condições controle de solvente (DMSO), tratamento com 2 mM CHC (CHC) e, exclusivamente na monocultura de células tumorais, os valores também foram comparados com a quantidade de lactato no sobrenadante de esferoides tumorais com 4 dias de cultura, ou seja, logo antes da adição dos monócitos (TU 4 dias). Os sobrenadantes são provenientes dos experimentos com a linhagem SW756 e macrófagos provenientes de monócitos de doadores saudáveis. (A) Concentração extracelular de lactato nas coculturas de células tumorais com macrófagos. (B) Concentração extracelular de lactato nas monoculturas de células tumorais. (C) Concentração extracelular de lactato nas monoculturas de macrófagos. As barras indicam diferença estatística entre as condições ($p < 0,05$). Dados provenientes de três experimentos independentes, quantificados em triplicatas experimentais.

As concentrações extracelulares de lactato também foram avaliadas com o tratamento com AZD, porém, neste caso, foram quantificados apenas os sobrenadantes de um experimento, em triplicata (triplicata experimental) e, por isso, não foi realizada a análise estatística. Porém, este

piloto nos mostrou que enquanto CHC claramente causou alterações na concentração extracelular de lactato, o AZD não parece alterar a concentração desta molécula em relação aos controles, em nenhuma condição de cultura (**Tabela 12 e Figura 39**). Portanto, com estes experimentos, foi possível concluir que os efeitos exercidos pelo CHC tem relação com alterações do transporte de lactato e que o AZD, nas concentrações utilizadas, não surtiu os mesmo efeitos.

Tabela 12. Médias e desvios padrões dos valores referentes a concentração extracelular de lactato (mg x dL-1) nas monoculturas e coculturas.

Valores calculados a partir da triplicata experimental de um experimento.

Amostra	DMSO	AZD	CHC
Cocultura	41,74 ± 2,99	40,08 ± 0,36	45,84 ± 2,75
Monocultura tumoral	17,15 ± 1,17	19,92 ± 1,24	28,28 ± 0,79
Monocultura de macrófagos	13,05 ± 0,50	12,57 ± 0,71	15,62 ± 0,92
Células tumorais com 4 dias de cultura	---	---	---

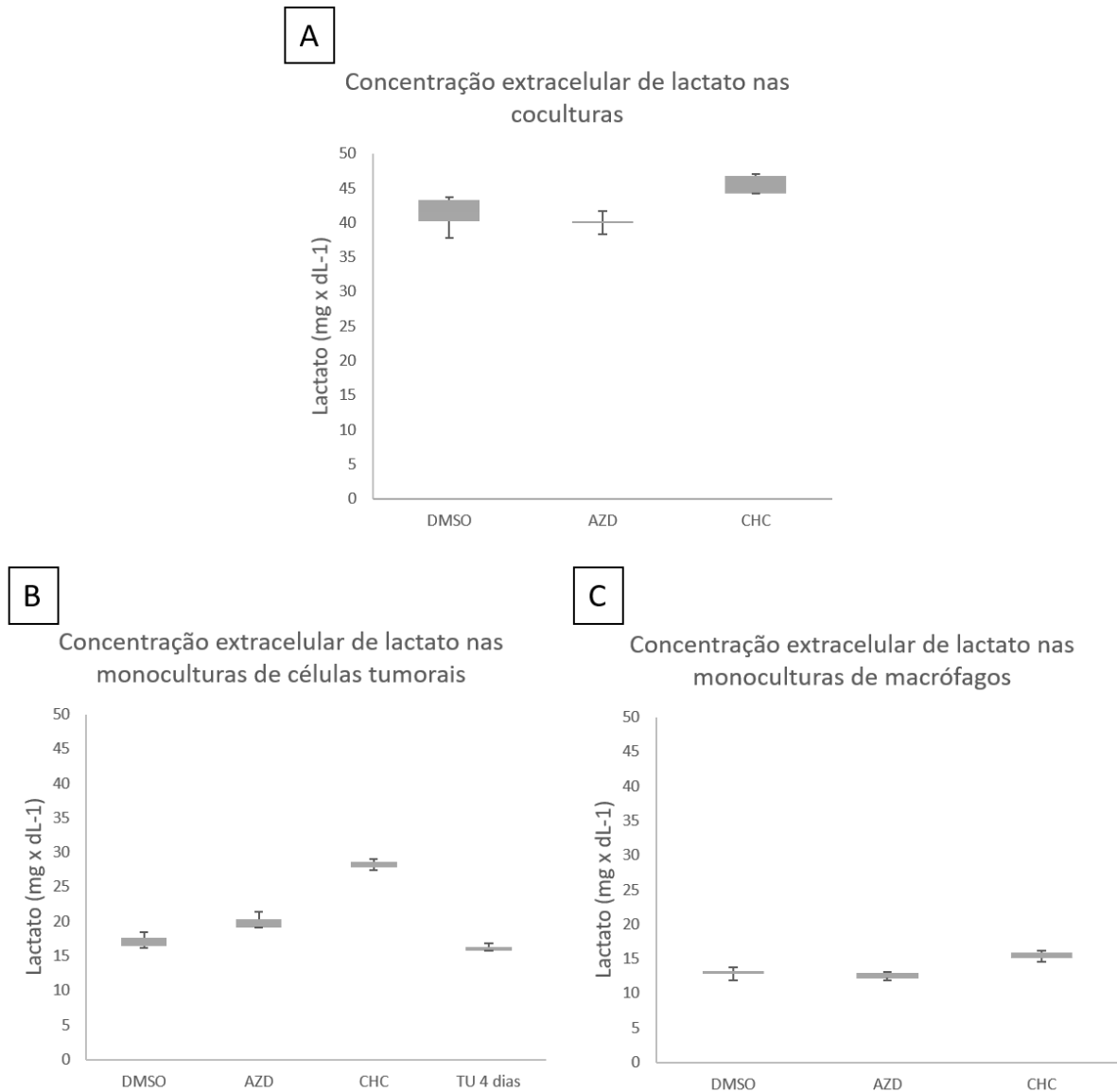


Figura 39. Concentrações extracelulares de lactato nas monoculturas e coculturas, nas condições controles e tratadas com CHC ou AZD.

As concentrações extracelulares de lactato, quantificadas a partir dos sobrenadantes das culturas, são mostradas nos gráficos em miligramas por decilitro, comparando as condições controle de solvente (DMSO), tratamento com 50 nM AZD (AZD), tratamento com 2 mM CHC (CHC) e, exclusivamente na monocultura de células tumorais, os valores também foram comparados com a quantidade de lactato no sobrenadante de esferoides tumorais com 4 dias de cultura, ou seja, logo antes da adição dos monócitos (TU 4 dias). Os sobrenadantes são provenientes dos experimentos com a linhagem SW756 e macrófagos provenientes de monócitos de doadores saudáveis. (A) Concentração extracelular de lactato nas coculturas de células tumorais com macrófagos. (B) Concentração extracelular de lactato nas monoculturas de células tumorais. (C) Concentração extracelular de lactato nas monoculturas de macrófagos. Os dados são provenientes de um experimento, quantificado em triplicata experimental e, por isso, não foi submetido à análise estatística.

4.8 Avaliação dos efeitos do CHC sobre coculturas de células tumorais da linhagem HeLa com monócitos de doadores saudáveis e pacientes com câncer do colo uterino

Como comentado anteriormente, nós tivemos a oportunidade de iniciar um piloto incluindo, além de monócitos de doadores saudáveis, monócitos provenientes de pacientes com câncer do colo uterino que foram cultivados com células tumorais da linhagem HeLa. Por se tratar de um piloto, nem todas as condições experimentais feitas para os experimentos com a linhagem SW756 puderam ser utilizadas nestes experimentos. Portanto, de forma semelhante aos experimentos comparando o CHC com o AZD, neste caso também fomos capazes de comparar apenas a frequência e número absoluto de células CD45+/CD14-, células tumorais TUMOR CD45- e macrófagos CD14+, comparando a condição controle (CTRL) com a condição tratada com 2 mM CHC (CHC). Foi possível observar aumento significativo da frequência de células CD45+/CD14-, tanto para os doadores (CTRL: $32,63 \pm 23,41$; CHC: $43,5 \pm 25,50$), como para as pacientes (CTRL: $22,35 \pm 19,45$; CHC: $34,63 \pm 22,39$) (**Figura 40A e C**), porém, o aumento não se mostrou significativo quando comparando o número absoluto de células (CTRL doadores: 15081 ± 11498 ; CHC doadores: 20551 ± 12919 ; CTRL pacientes: 11440 ± 13834 ; CHC pacientes: $14138 \pm 9778,4$) (**Figura 40B e D**).

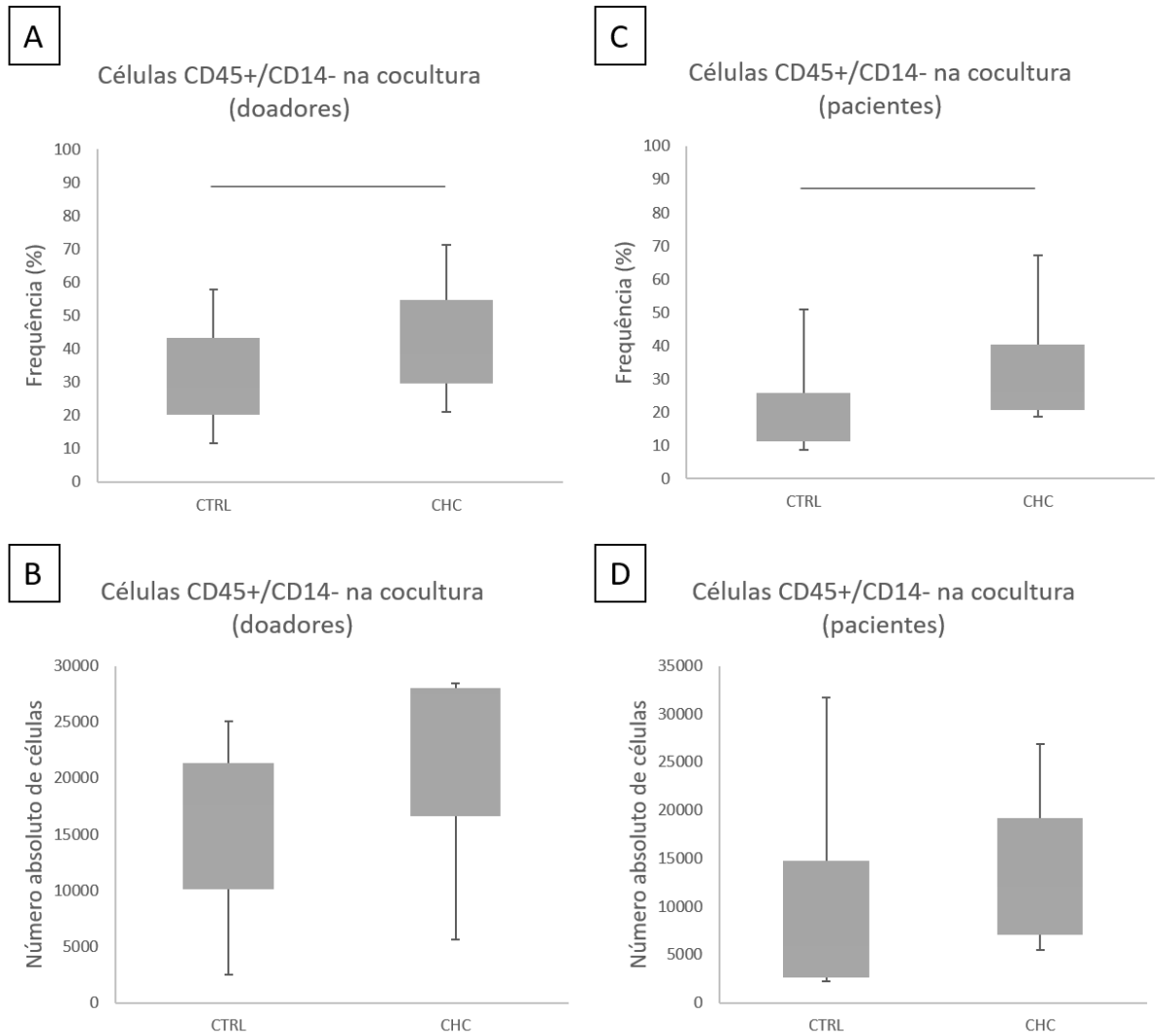


Figura 40. Frequência e número absoluto de células CD45+/CD14- na cocultura de células tumorais com macrófagos de doadores saudáveis e pacientes com câncer do colo do útero.

A frequência (A e C) e número absoluto (B e D) de células CD45+/CD14- de doadores saudáveis (A e B) e pacientes com câncer cervical (C e D) é mostrada em gráfico, para as duas condições estudadas nos experimentos com a linhagem tumoral HeLa: controle (CTRL) e tratamento com 2 mM de CHC (CHC). As barras indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Dados provenientes de experimentos independentes com 3 doadores e quatro pacientes.

Em relação às células tumorais TUMOR CD45-, da mesma forma que antes, nós comparamos a frequência e número absoluto de células tumorais vivas. Diferente do que havia sido observado previamente, não houve redução significativa da frequência (CTRL doadores: $27,41 \pm 5,24$; CHC doadores: $23,38 \pm 9,44$; CTRL pacientes: $32,83 \pm 5,15$; CHC pacientes: $24,80 \pm 7,58$) ou número absoluto (CTRL doadores: $11248 \pm 5225,7$; CHC doadores: $11272 \pm 8759,9$; CTRL pacientes: $13783 \pm 7516,7$; CHC pacientes: 10206 ± 5621) dessas células com o tratamento, em nenhum dos grupos (doadores e pacientes), apesar de ser possível observar

uma tendência, que se mostra mais evidente para os pacientes (**Figura 41C e D**). Nós acreditamos que a ausência de diferenças proeminentes e significativas, tenha ocorrido por conta da variabilidade humana, isso porque, ao analisarmos estes parâmetros amostra por amostra, é possível observar que enquanto um doador e três pacientes claramente mostram diminuição da frequência e número absoluto de células, um doador parece não responder ao tratamento e um doador e um paciente resultam em aumento da frequência de células tumorais ao final o experimento (**Figura 42**).

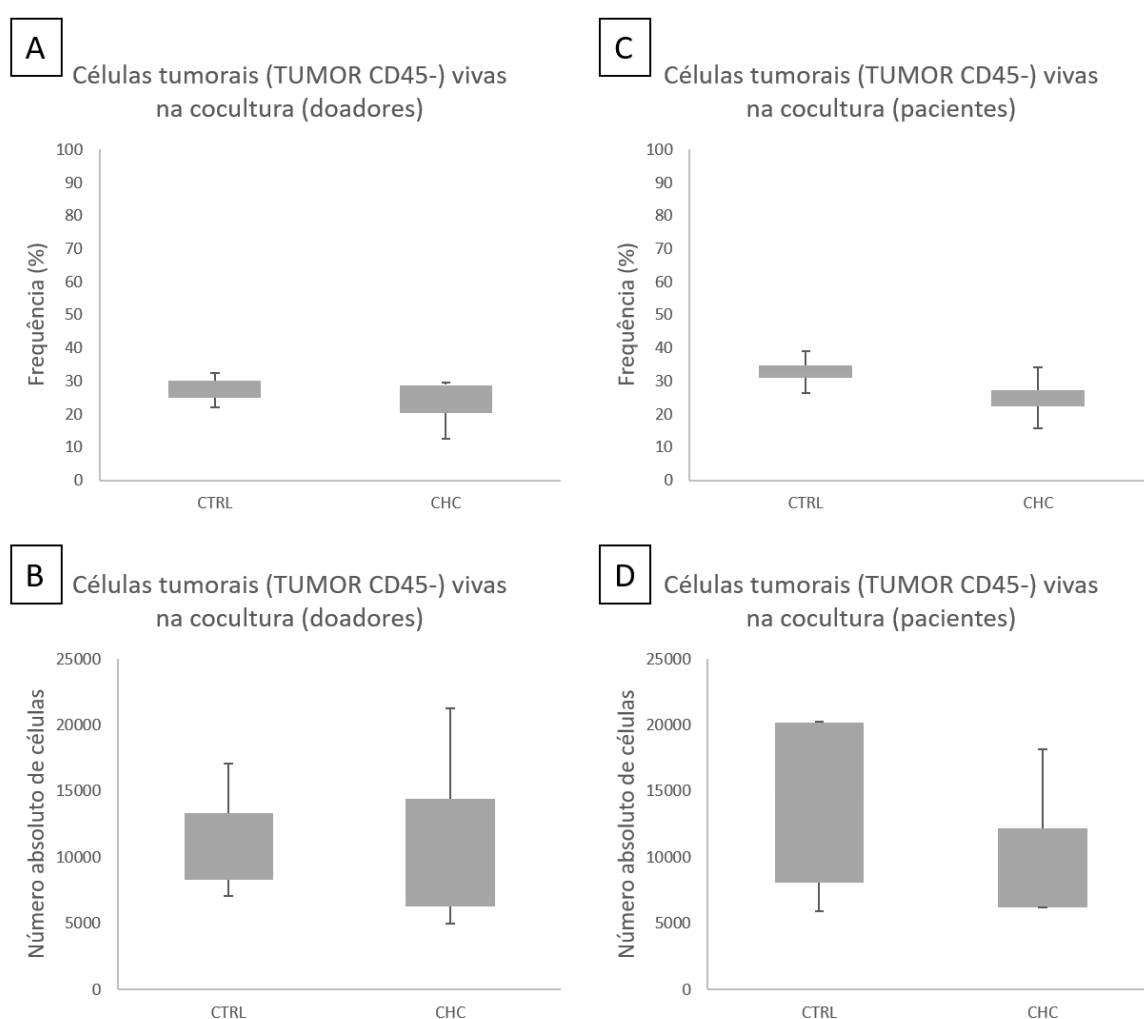


Figura 41. Frequência e número absoluto de células tumorais TUMOR CD45- vivas na cocultura de células tumorais com macrófagos de doadores saudáveis e pacientes com câncer do colo do útero.

A frequência (A e C) e número absoluto (B e D) de células tumorais TUMOR CD45-, provenientes da cocultura com macrófagos de doadores saudáveis (A e B) e pacientes com câncer cervical (C e D), é mostrada em gráfico, para as duas condições estudadas nos experimentos com a linhagem tumoral HeLa: controle (CTRL) e tratamento com 2 mM de CHC (CHC). Não há diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Dados provenientes de experimentos independentes com 3 doadores e quatro pacientes. TUMOR CD45- = células tumorais CD14-/CD45-.

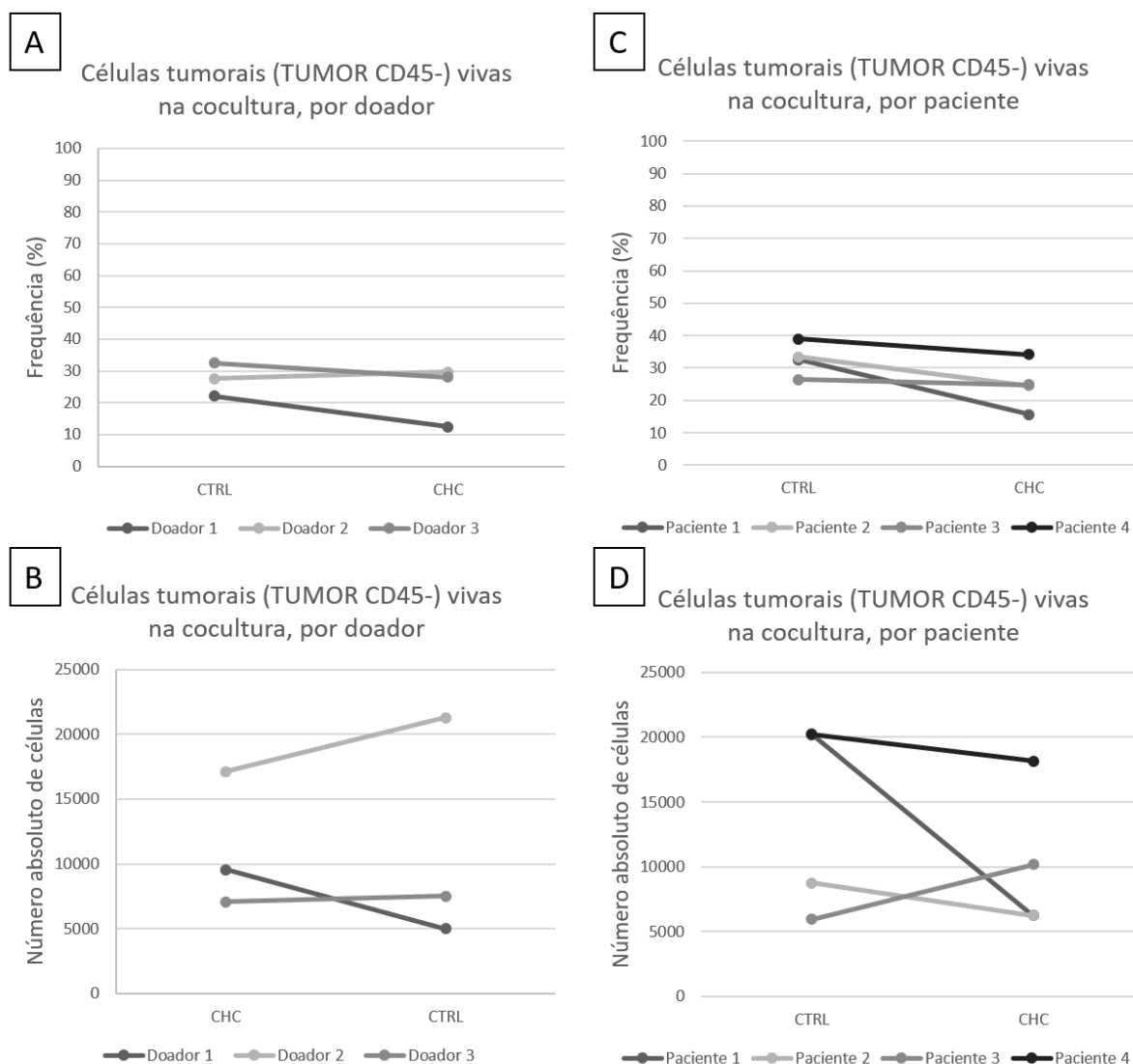


Figura 42. Frequência e número absoluto de células tumorais TUMOR CD45- vivas na cocultura de células tumorais com macrófagos de doadores saudáveis e pacientes com câncer do colo do útero, amostra por amostra.

A frequência (A e C) e número absoluto (B e D) de células tumorais TUMOR CD45-, provenientes da cocultura com macrófagos de doadores saudáveis (A e B) e pacientes com câncer cervical (C e D), é mostrada em gráfico, para as duas condições estudadas nos experimentos com a linhagem tumoral HeLa: controle (CTRL) e tratamento com 2 mM de CHC (CHC). Os valores são mostrados para cada amostra, separadamente. Dados provenientes de experimentos independentes com 3 doadores e quatro pacientes. TUMOR CD45- = células tumorais CD14-/CD45-.

Finalmente, em relação aos macrófagos CD14+, nós comparamos a população total destas células (da mesma maneira previamente feita). O tratamento com CHC não causou diminuição significativa da frequência (CTRL doadores: $19,5 \pm 8,05$; CHC doadores: $12,89 \pm 5,06$; CTRL pacientes: $17,88 \pm 6,74$; CHC pacientes: $14,58 \pm 6,94$) ou número de células (CTRL doadores:

9317,2 ± 7443,2; CHC doadores: 6655,7 ± 5230,2; CTRL pacientes: 7539,3 ± 4911,1; CHC pacientes: 6324,6 ± 3764,3) totais destas células na cocultura (**Figura 43**) e, ao se olhar os dados amostra por amostra, é possível observar que há uma tendência geral de diminuição na frequência e número absoluto de macrófagos CD14+, resultados que não diferem do que havia sido observado previamente (**Figura 44**).

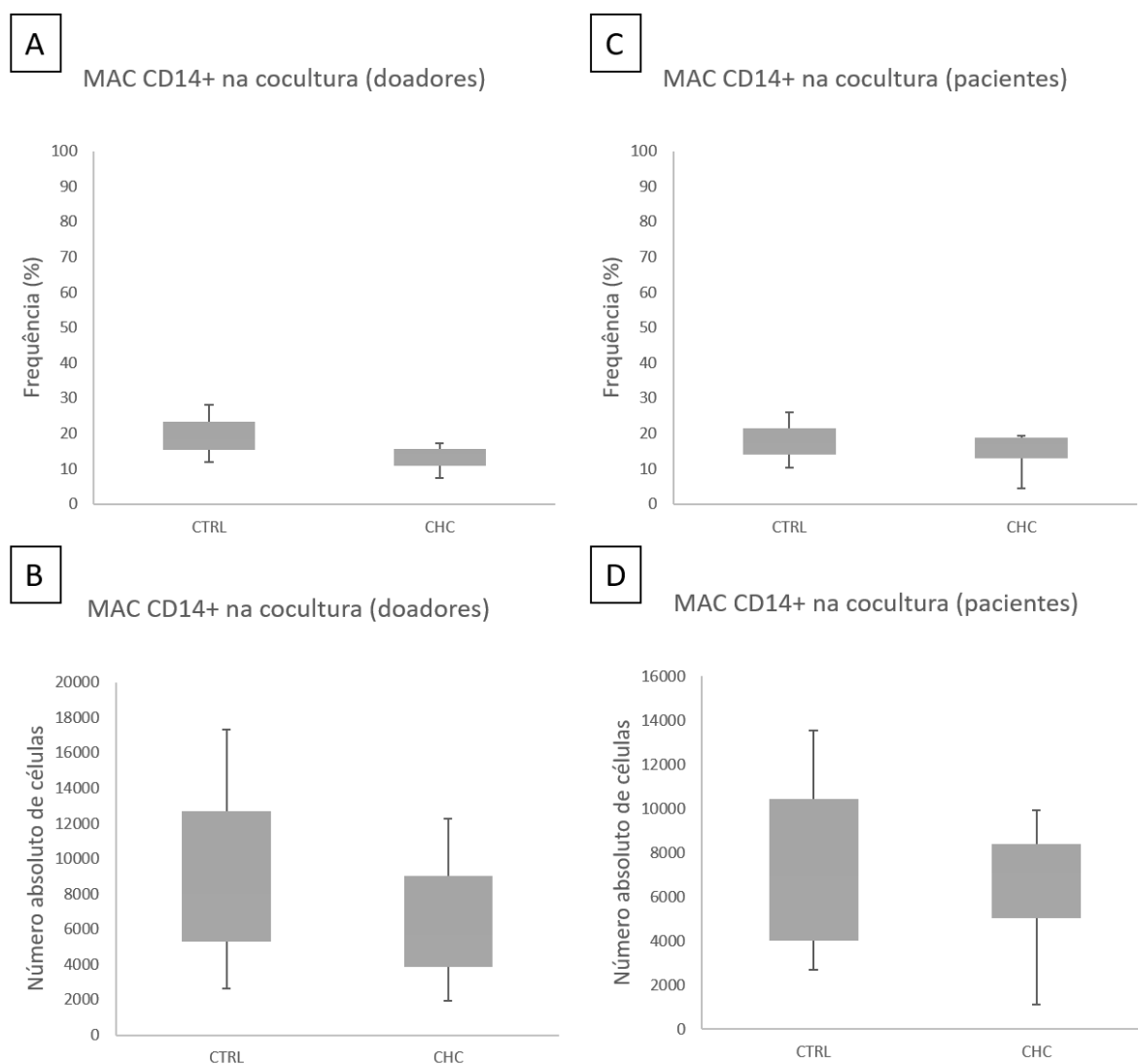


Figura 43. Frequência e número absoluto de macrófagos CD14+ na cocultura de células tumorais com macrófagos de doadores saudáveis e pacientes com câncer do colo do útero.

A frequência (A e C) e número absoluto (B e D) de macrófagos CD14+, provenientes da cocultura com células tumorais da linhagem HeLa, são mostrados em gráfico para as doadoras saudáveis (A e B) e pacientes com câncer cervical (C e D), comparando as duas condições estudadas nos experimentos com a linhagem tumoral HeLa: controle (CTRL) e tratamento com 2 mM de CHC (CHC). Não há diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Dados provenientes de experimentos independentes com 3 doadores e quatro pacientes.

MAC CD14+ = macrófagos CD14+.

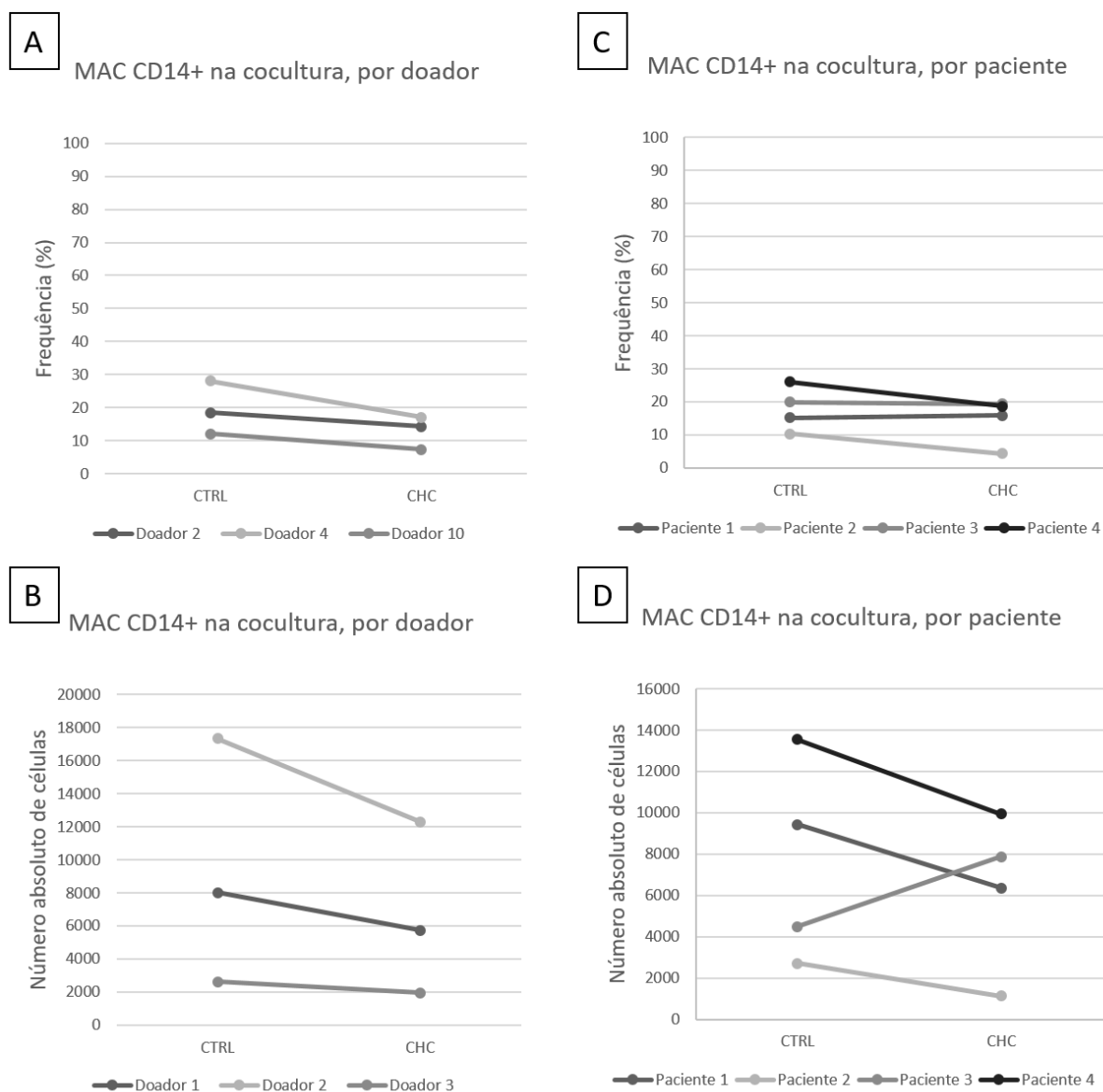


Figura 44. Frequência e número absoluto de macrófagos CD14+ na cocultura de células tumorais com macrófagos de doadores saudáveis e pacientes com câncer do colo do útero, amostra por amostra.

A frequência (A e C) e número absoluto (B e D) de macrófagos CD14+, provenientes da cocultura células tumorais da linhagem HeLa, são mostrados em gráfico para as doadoras saudáveis (A e B) e pacientes com câncer cervical (C e D), comparando as duas condições estudadas nos experimentos com a linhagem tumoral HeLa: controle (CTRL) e tratamento com 2 mM de CHC (CHC). Os valores são mostrados para cada amostra, separadamente. Dados provenientes de experimentos independentes com 3 doadores e quatro pacientes.

MAC CD14+ = macrófagos CD14+.

Desta forma, este piloto nos leva a indicar que é possível que o CHC exerça efeito também sobre células já moduladas pela existência de tumor, porém, a variabilidade humana presente nas amostras indica que nem todas as pacientes irão responder ao tratamento.

5 DISCUSSÃO

Alterações metabólicas compõem um dos marcos do câncer, sustentando as atividades necessárias para a progressão tumoral. Além disso, a evasão da resposta imune e o estímulo da inflamação com efeitos pró-tumorais também são características da doença (2), sendo os macrófagos associados a tumores (TAMs) potenciais aliados das células neoplásicas (83). Porém, diversos estudos têm demonstrado que o fenótipo pró-tumoral das TAMs, similar ao fenótipo M2, é reversível (158-161). Sabendo disso, e das diferenças entre o metabolismo de células tumorais e macrófagos, neste trabalho nós objetivamos testar se o tratamento de coculturas de células tumorais e monócitos em diferenciação para macrófagos com o inibidor do transportador de monocarboxilatos, CHC, seria capaz de prejudicar a progressão tumoral, sem causar danos a viabilidade dos macrófagos. Além disso, nós investigamos outros efeitos que o tratamento poderia possuir sobre macrófagos que contribuísse para uma melhor resposta antitumoral.

Como mostrado nos resultados, o tratamento de células tumorais com o CHC, sozinhas ou em cocultura com macrófagos, diretamente causou diminuição da frequência de células tumorais vivas e aumento da frequência de células tumorais mortas. Estes resultados corroboram com outros trabalhos disponíveis na literatura que mostraram a capacidade deste inibidor em causar a morte de células tumorais (39, 162, 163), sob diferentes abordagens. Isto porque o transporte de lactato pelos MCTs é dependente do gradiente desta molécula através da membrana plasmática e do metabolismo da célula em questão (119) e, portanto, o CHC pode prejudicar a atividade das células tumorais por impedir o efluxo ou o influxo do lactato pelas mesmas, dependendo da atividade metabólica das células tratadas; esta característica do transporte explica os diferentes mecanismos de morte desencadeados por este tratamento em diferentes estudos.

Os trabalhos de Colen *et al.* e Kim *et al.* mostram que o aumento de necrose observado em seus experimentos é decorrente do impedimento do efluxo do lactato produzido pelas células tumorais em questão, que são altamente glicolíticas, causando acidificação intracelular que leva a morte das células (162, 163). Por outro lado, o trabalho de Sonveaux e colaboradores demonstrou que a morte das células tumorais tratadas com CHC foi em decorrência da competição das células por glicose, isto porque o tratamento impediu que as células com

metabolismo oxidativo utilizassem o lactato como fonte de carbono e, por isso, estas células passaram a consumir glicose, competindo pela mesma com as células hipóxicas glicolíticas que, sem glicose, morrem (39).

Sendo assim, nós nos perguntamos qual seria o mecanismo envolvido na morte das células tumorais no nosso cenário. O fato de que os efeitos contra a viabilidade das células tumorais não foram significativamente observados após três dias de tratamento, tendo sido evidenciados com clareza somente seis dias após a adição do CHC à cultura, sugere que no nosso caso, a acidificação intracelular pode não ser a responsável pela morte destas células já que, se este fosse o caso, seria esperado observar significativo aumento da morte já em três dias após o tratamento, considerando que a acidificação seria um efeito agudo observado logo após o tratamento. Ainda não foi documentada na literatura por quanto tempo o CHC é capaz de permanecer exercendo inibição na cultura, porém, é esperado que a inibição seja maior logo após a administração do mesmo na cultura e que com o tempo a inibição diminua. De fato, o estudo de Bola e colaboradores mostrou que a inibição do transporte de MCT1 utilizando o AZD 3965 pôde ser observada em períodos de tratamento tão curtos como 24 horas, onde os pesquisadores observaram aumento significativo das concentrações de lactato intracelulares nas células tratadas (151). Desta forma, sabendo que o aumento da concentração intracelular de lactato é acompanhada de acidificação celular, e que isto é um efeito que já pode ser observado em 24 horas de tratamento, os resultados aqui apresentados sugerem que outro mecanismo está por trás dos efeitos observados sobre às células tumorais.

A tendência de aumento da concentração extracelular de lactato, observada especialmente nas monoculturas, indica que, realmente, esta dose de CHC interferiu com o transporte desta molécula e que os efeitos citotóxicos sobre as células tumorais não parecem ter sido mediados por impedimento do efluxo de lactato pois, se este fosse o caso, provavelmente nós observaríamos uma diminuição da concentração extracelular do mesmo. De fato, o estudo prévio de Pinheiro e colaboradores demonstrou, por meio da análise por imunohistoquímica de biópsias da cérvix uterina, que há aumento, na transição de normalidade para malignidade, da expressão de MCT1 e MCT4 no epitélio escamoso (130). A linhagem SW756 é derivada de carcinoma celular escamoso da cérvix uterina (164) e, portanto, é esperado que estas células apresentem expressão de MCT4. Como o CHC inibe o MCT1 com maior seletividade do que o MCT4 (146), nossa hipótese é que, deveras, as células em questão não tenham morrido por acidificação intracelular, já que ainda seriam capazes de exportar o lactato através do MCT4, ainda que não com a mesma eficiência do que sem a inibição. De fato, já foi demonstrado que

a expressão de MCT4 é responsável pela resistência ao tratamento de tumores glicolíticos com inibidores de MCT1 (152).

A aparente tendência de aumento da concentração extracelular de lactato pode ser um indicativo de que a morte causada pelo CHC foi decorrente do impedimento da utilização de lactato como fonte de carbono pelas células. Como comentado anteriormente, as células tumorais HPV positivas, como a SW756, realizam glicólise e oxidação fosforilativa, sendo capazes de se adaptar quando no impedimento de realizar glicólise (Stone *et al.*, 2017, dados não publicados). Nosso trabalho sugere, porém, que a limitação de um substrato importante para alimentar o ciclo de Krebs pode, por sua vez, apresentar prejuízos às células tumorais desta linhagem por aumentar a competição por glicose no microambiente, semelhante ao que foi observado no trabalho de Sonveaux e colaboradores (39). Considerando a realidade destes experimentos *in vitro*, onde durante seis dias o meio de cultura não é trocado, é esperado que, de forma semelhante a realidade no câncer, possa haver uma competição por glicose pelas células presentes nos poços, ainda mais caso seja impedida a utilização de outros substratos que diminuiriam esta competição.

Esta hipótese faz ainda mais sentido ao lembrarmos que utilizamos em nossos experimentos o modelo de cultura tridimensional, no qual há de fato uma diferença da pressão de oxigênio no esferoide, já que as células do centro da esfera tem menor acesso aos gases (e nutrientes) do que as células da periferia, caracterizando uma região hipóxica que pode ter perdido a competição pela glicose, aumentada pelo tratamento com CHC. Esferoides com diâmetro maior do que 0,4 mm desenvolvem centro hipóxico e ativam vias de sinalização de sobrevivência para manter a viabilidade (148); como mostrado na seção de materiais e métodos, nossos esferoides possuem mais de 1mm e, portanto, apresentam região central hipóxica e reforçam a possibilidade da hipótese ser verdadeira. Além disso, como o consumo de glicose e, portanto, a diminuição da disponibilidade da mesma, é algo que ocorre de forma gradativa, isso poderia explicar porque os efeitos só foram significativamente observados após seis dias do tratamento. Portanto, nossos dados indicam que a morte tumoral observada com o tratamento é decorrente de uma maior competição por glicose desencadeada pelo impedimento do influxo de lactato, porém, mais experimentos são necessários para confirmar esta hipótese, como a quantificação extracelular de glicose nos sobrenadantes.

Apesar do CHC ser capaz de causar a morte de células tumorais, como demonstrado aqui, a taxa de morte observada evidencia que a utilização deste inibidor na dose de 2 mM, sem

associação com outros tratamentos, não é capaz de sozinha combater eficientemente o tumor. Desta forma, nossos dados reforçam a utilização do CHC como um bom adjuvante para outras terapias. De fato, a utilização deste inibidor em associação com a radioterapia já demonstrou ser bem sucedida, por aumentar a sensibilidade das células tumorais a radiação, tanto em tumores altamente glicolíticos, onde o CHC causa diminuição de moléculas anti-oxidantes (165), como em tumores com ambas as regiões com predominância de oxidação fosforilativa e regiões hipóxicas glicolíticas, onde o CHC causa aumento da pressão de oxigênio, contribuindo para os efeitos da radiação (39).

Além de contribuir para os efeitos citotóxicos da radioterapia, o CHC também pode contribuir na resposta antitumoral devido seus efeitos sobre outras células do microambiente tumoral. Por exemplo, diferentes trabalhos da literatura demonstraram que a internalização de lactato por meio de MCT1 em células endoteliais contribui para a angiogênese, por causar a fosforilação de I κ B α , estimulando a via de NF- κ B/IL-8, causando migração celular e formação de vasos (166), e por levar a ativação de HIF-1 α , o que causa aumento da expressão do receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2) e do fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), também contribuindo para a angiogênese (167). Nesse cenário, o bloqueio de MCT1 com a utilização de CHC inibiu a ativação de HIF-1 α , causando efeitos anti-angiogênicos (167). Além disso, como comentado anteriormente, o lactato induz a polarização de macrófagos para perfil M2 (123, 129), os quais classicamente possuem atividades pró-tumorais (104). Sabendo que os efeitos imunossupressores do lactato sobre macrófagos são mediados por MCT1, nós também investigamos neste trabalho os efeitos do CHC sobre os macrófagos.

Estudos prévios demonstraram que o tratamento de macrófagos murinos derivados de medula óssea com 1 mM de CHC não revelou toxicidade contra estas células (168). Extrapolando estes achados, nossos experimentos demonstraram de forma consistente que a dose de 2 mM de CHC também não apresenta efeitos tóxicos para macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico de doadores saudáveis. Apesar de não diminuir a viabilidade, o CHC demonstrou exercer outros efeitos sobre os macrófagos.

O primeiro fenômeno observado sobre macrófagos tratados com CHC foi a redução do tamanho e granulosidade destas células, visualizada por citometria de fluxo. A diminuição destes parâmetros pode indicar processo apoptótico (169), causando as alterações vistas nos *dot-plots* de tamanho por granulosidade. Porém, este não é o caso para estes experimentos, já

que a análise de apoptose e necrose com a utilização de Anexina V e 7AAD não revelou aumentos significativos destes parâmetros com o tratamento, em relação aos controles; do contrário, estes experimentos mostraram diminuição da frequência de macrófagos mortos.

Outra possibilidade seria a de que o tratamento tivesse impedido a diferenciação dos monócitos em macrófagos, já que uma característica da diferenciação de macrófagos é o aumento do tamanho das células (170, 171) e, portanto, o menor tamanho em consequência do tratamento poderia significar que as células não diferenciaram. Porém, este também não parece ser o caso, já que os únicos monócitos que seriam capazes de sobreviver durante os seis dias de cultura seriam os monócitos não clássicos (CD14^{lo}CD16⁺), os quais apresentam alta expressão de HLA-DR (172) e, em nosso caso, com o tratamento pudemos observar diminuída expressão de HLA-DR. Já foi demonstrado na literatura que existem na doença obstrutiva pulmonar crônica macrófagos de maior e menor tamanho (173, 174). Estes achados, e o fato de que o cultivo de monócitos com soro (no nosso caso, com soro fetal bovino) leva a diferenciação de macrófagos (175), nos indica que estas células correspondem a macrófagos de menor tamanho. Isto também nos leva a considerar que a diferença de tamanho e granulocidade observada possa ter relação com a função destas células.

Nós então investigamos as diferenças fenotípicas causadas pelo tratamento com CHC, focando em 3 marcadores: CD14, HLA-DR e CD86. Nestes experimentos foi possível observar que a cocultura dos monócitos com as células tumorais, nas condições controles, causou aumento significativo da expressão da molécula CD14, em relação a monocultura. Porém, o tratamento dos monócitos com CHC anulou este efeito e, mais do que isso, resultou em expressão significativamente menor desta molécula em relação aos controles, tanto na monocultura, quanto na cocultura. Além disso, o tratamento causou o aumento significativo da frequência de uma subpopulação de células que não expressam CD14, apesar de serem CD45⁺ e HLA-DR⁺.

Em relação aos outros marcadores (HLA-DR e CD86), um achado importante foi o de que, nas condições controles, o cultivo dos macrófagos com células tumorais resultou em diminuição significativa da expressão dessas moléculas nos macrófagos, em relação a monocultura destas células. A ativação do fator de transcrição NFκB tem relação com a indução da expressão das moléculas HLA-DR e CD86 (176-178) e já foi demonstrado que a expressão deste fator de transcrição é inibida por lactato (40) e, sendo assim, é possível imaginar que a diminuição da expressão destas moléculas possa ser resultado da inibição de NFκB por lactato. Além disso,

outros trabalhos prévios do laboratório mostraram que a inibição deste fator está sobre controle parcial da ativação de STAT3 (Rossetti *et al.*, 2019, em submissão). De fato, já foi demonstrada a ativação constitutiva do eixo IL-6/STAT3 no tumor e nos TAMs, em modelo murino de câncer da cérvix uterina (179). Sabendo que o impedimento da captação de lactato pelos macrófagos com a utilização do CHC não foi capaz de sozinho recuperar a expressão de HLA-DR e CD86 (tendo, na verdade, causado diminuição da expressão das mesmas, mesmo sem a presença de células tumorais), estes achados nos levam a considerar que, possivelmente, a diminuição na expressão destas moléculas pelos macrófagos ao serem cultivados com as células tumorais possa ser resultado também da inibição de NFκB devido à atividade de STAT3 nas células tumorais e nos TAMs e, portanto, uma perspectiva interessante seria a utilização de inibidor de STAT3 em combinação com CHC, objetivando diminuir os efeitos imunossupressores do microambiente tumoral sobre os macrófagos.

Sendo assim, de forma geral, foi observado que, apesar da existência de diferenças na expressão de HLA-DR e CD86 entre a monocultura tratada e as monoculturas controles, não há diferença entre as condições na expressão destas moléculas entre as células provenientes da cocultura com células tumorais. Falando de outra forma, as diferenças na expressão destas moléculas que eram causadas pelo tratamento são eliminadas pelos estímulos provenientes do cultivo com células tumorais, indicando que, para estas moléculas, o contato com células tumorais exerce maior influência em sua expressão do que o tratamento. Em relação a frequência, o mesmo fenômeno foi observado para HLA-DR nos macrófagos CD14⁺ e, como explicado anteriormente, não há diferença na frequência desta molécula nos macrófagos CD14⁻ pois a expressão de HLA-DR é um dos critérios para pertencer a esta população. Já em relação a frequência de células CD86 positivas, o fenômeno se repete para os macrófagos CD14⁻, porém, para os macrófagos CD14⁺, a presença de células tumorais não foi capaz de anular a diminuição significativa da frequência de células positivas para este marcador causadas pelo tratamento, sendo esta a única exceção ao efeito anulador que a cocultura apresentou possuir sobre os efeitos do tratamento aos macrófagos.

Desta forma, estes resultados mostraram que os efeitos que o tratamento com CHC exerceram sobre os macrófagos, que não foram anulados pela interação com células tumorais, foram a diminuição do tamanho, granulosidade e expressão de CD14, o aparecimento de população CD14⁻ e a diminuição da frequência de macrófagos CD14⁺/CD86⁺. A expressão de CD14 entre monócitos e macrófagos é variada, existindo monócitos com alta e baixa expressão (monócitos clássicos e não clássicos, respectivamente), assim como macrófagos (por exemplo,

macrófagos peritoneais e alveolares, respectivamente). Além disso, dependendo do estímulo que recebem, a expressão de CD14 pelas células pode aumentar, diminuir, ou não mudar, como já discutido por Andreesen e colaboradores e Ziegler-Heitbrock desde 1990 (180, 181). Por exemplo, a diferenciação de monócitos para macrófagos causa diminuição da expressão de CD14 (182), inclusive para monócitos diferenciados a partir de M-CSF ou GM-CSF (183). Porém, diferentes estímulos podem também interferir na expressão, podendo aumentá-la ou diminuí-la. Por exemplo, já foi demonstrado há anos que o estímulo de monócitos do sangue com IFN- γ causa a diminuição da expressão de CD14, enquanto LPS induz aumento da expressão em baixas concentrações, mas causa diminuição em altas concentrações (184).

No caso da polarização de macrófagos, foi demonstrado que macrófagos com perfil M2, ativados por IL-10, possuem maior expressão de CD14 do que macrófagos com perfil M1 (185). Além disso, este mesmo estudo mostrou que a expressão de CD86 não varia entre os macrófagos M1 e M2. Porém, também existem trabalhos demonstrando que macrófagos com perfil M2, ativados por IL-4, apresentam diminuição da expressão de CD14 (186) e um recente estudo mostrou que os TAMs apresentam ainda menor expressão de CD14 do que macrófagos M1 e M2 (187). Sendo assim, até o presente momento não pudemos compreender com clareza o que as alterações fenotípicas significam nestes experimentos, até porque a caracterização do perfil de polarização de macrófagos necessita de avaliação de diversos marcadores fenotípicos e funcionais, não sendo suficiente apenas a análise das três moléculas aqui investigadas (CD14, CD86 e HLA-DR).

Apesar disso, nós suspeitamos que a diferenciação dos monócitos para um perfil mais semelhante a M1 possa acontecer com o tratamento com CHC, já que, ao inibir o MCT1, esta substância poderia causar a mudança do metabolismo das células para o perfil glicolítico, classicamente característico dos macrófagos M1. De fato, foi possível observar aumento significativo da quantidade de lactato extracelular nas monoculturas de macrófagos tratadas com o CHC, o que pode indicar um perfil mais glicolítico destas células, já que o lactato ainda poderia ser exportado pelo MCT4 nos macrófagos tratados. Além disso, na cocultura, o CHC traria uma vantagem extra, ao inibir a captação e, portanto, os efeitos imunossupressores, do lactato.

Além dos efeitos sobre o fenótipo, o tratamento com CHC também causou diminuição da frequência de macrófagos mortos, um efeito que se mostrou significativo na cocultura destas células com células tumorais. Apesar de não ser significativo na monocultura, os gráficos dos

experimentos mostram tendência de diminuição da frequência de macrófagos mortos e de aumento da frequência de células vivas. De fato, nós observamos em nossos experimentos uma tendência de aumento do número total de macrófagos com o tratamento com CHC, o que poderia ser explicado por diminuição da morte em decorrência do tratamento. Há muito tempo se sabe que a ativação de monócitos, levando a diferenciação em macrófagos, envolve a manifestação de diversos fenômenos, como o aumento da atividade metabólica e sinais de sobrevivência; neste sentido, Perera e Waldmann mostraram que a ativação de monócitos humanos com produtos bacterianos, como LPS, resultou em resistência a apoptose, particularmente àquela induzida por DAMPs, por meio da diminuição da expressão de caspase-8/FLICE e indução de Bfl-1, o membro anti-apoptótico da família Bcl-2 (188). Não existem evidências até o momento de que o CHC cause estes mesmos efeitos, porém, estas informações nos fazem questionar se o CHC não poderia contribuir para a ativação destas células ao induzir a glicólise nas mesmas, ativação esta que poderia então ser a responsável por aumentar a resistência a apoptose. São necessários mais estudos para melhor compreender os efeitos do CHC sobre esta via e para confirmar se o aumento da viabilidade dos macrófagos após o tratamento só ocorre na presença de células tumorais ou se a falta de significância estatística na monocultura é apenas resultado de pequeno grupo amostral.

Um dado interessante deste estudo é que, em concordância com o trabalho de Stone e colaboradores (40), o cultivo das células tumorais com os monócitos/macrófagos proporcionou aumento da viabilidade daquelas células, confirmando que os macrófagos contribuem para a progressão tumoral. Este aumento de viabilidade ocorreu mesmo com o tratamento com CHC, mostrando que o mesmo não foi capaz de abolir as influências pró-tumorais das células mielóides. Porém, felizmente, o CHC foi eficiente em diminuir a intensidade deste efeito já que, como mostrado nos resultados, a viabilidade das células tumorais cultivadas com macrófagos provenientes da condição tratada com CHC se mostrou menor do que a viabilidade destas células quando cultivadas com macrófagos nas condições controles. Além disso, a viabilidade destas células cultivadas com macrófagos e tratadas com CHC não se mostrou diferente da viabilidade das células tumorais em monocultura não tratadas. Sendo assim, estes resultados reforçam que o CHC é um potencial candidato a translação pois, além de causar danos diretamente às células tumorais, também se mostrou capaz de inibir, pelo menos em partes, os efeitos pró-tumorais dos macrófagos.

Como o CHC possui outros efeitos além da inibição de MCT1, como a inibição de MCT4 (apesar de com expressiva menor afinidade) (146) e a inibição do transportador mitocondrial

de piruvato (189-192), para melhor compreender a relação dos fenômenos observados com o transporte de lactato, nós comparamos o CHC com o inibidor específico de MCT1, AZD 3965 (147). Para isso, nós testamos 3 diferentes concentrações deste inibidor (5, 25 e 50 nM) com base nas doses já utilizadas na literatura e que se mostraram capazes de inibir o MCT1, com estudos observando efeitos inibitórios com concentrações tão baixas quanto 2 nM (150-153). Nenhuma das concentrações apresentaram diferenças entre si nos parâmetros avaliados e, portanto, nós seguimos os experimentos com a dose mais alta (50 nM). Para nossa surpresa, o AZD nesta concentração não causou os mesmo efeitos que o CHC e diferentes possibilidades podem estar por trás deste achado. É possível que a dose de AZD escolhida (50 nM) ainda não seja a suficiente para inibir de forma expressiva a atividade de MCT1 em células tumorais e macrófagos. Esta é uma possibilidade válida, já que a sensibilidade ao tratamento é diferente entre diferentes linhagens de células tumorais (153) e pode ser também diferente nos macrófagos.

Outra possibilidade é que os efeitos que foram observados com o tratamento com CHC não sejam totalmente causados apenas pela interferência no transporte de lactato, já que ultimamente têm aumentado o número de trabalhos relacionando os efeitos causados pelo tratamento com CHC ao transporte de piruvato. Vale ressaltar que o AZD também pode interferir no transporte de piruvato, mas não da mesma forma do CHC, isto porque o AZD tem a capacidade de interferir com o transporte de piruvato apenas pelo MCT1 (150), enquanto o CHC é capaz de interferir nesta atividade tanto por bloquear MCT1, como também por bloquear o transportador mitocondrial de piruvato, como discutido previamente. De fato, o estudo de Diers e colaboradores mostrou que o tratamento de células tumorais com CHC causou diminuição do crescimento tumoral devido a inibição pelo CHC da importação de piruvato; com isso, os autores sugerem que a inibição do transporte de piruvato pode ser um efeito que soma ao bloqueio do transporte de lactato, contribuindo para os efeitos antitumorais causados pelo CHC. Os autores ainda discutem que, como o CHC é mais efetivo em inibir o transporte mitocondrial do que o transporte a nível de membrana plasmática, provavelmente os efeitos observados foram consequência da inibição do transporte mitocondrial de piruvato, e não do transporte pelo MCT1 (193), o que explicaria porque o mesmo efeito não foi atingido com o AZD 3965.

O impedimento da importação de piruvato para a mitocôndria pode, de fato, contribuir para os prejuízos causados a células tumorais, já que o mesmo é necessário no ciclo de Krebs para a biossíntese de macromoléculas necessárias para sustentar a rápida proliferação de células

tumorais (193-195). Concentrações de 1 mM de CHC já se mostraram capazes de inibir o transporte de piruvato pelo seu transportador mitocondrial (196) e, dessa forma, não podemos descartar a possibilidade de que os efeitos aqui observados possam resultar de um somatório de efeitos sobre o transporte de lactato e piruvato. Desta forma, mais experimentos são necessários para investigar o mecanismo por trás dos efeitos do CHC.

Por fim, os resultados de nosso piloto com monócitos de pacientes com câncer do colo uterino levantam indícios de que o tratamento com CHC seria capaz de causar a diminuição da frequência de células tumorais vivas, mesmo na presença de macrófagos diferenciados a partir de monócitos já modulados pela existência de tumor. Apesar de ser possível observar que as culturas cultivadas com os monócitos de alguns indivíduos responderam ao tratamento, a diminuição não se mostrou estatística e nós suspeitamos que o motivo da ausência da significância seja a variabilidade humana, já que é possível observar que alguns indivíduos, tanto do grupo de doadores, como do grupo de pacientes, não responderam ao tratamento. Isso reforça a necessidade de associação do CHC com outras terapias e revela que, apesar de possuir o potencial para contribuir numa resposta antitumoral, é possível que nem todos os indivíduos tratados com este inibidor respondam ao mesmo, o que é uma problema recorrente na oncologia, devido à grande variabilidade genética de tumores.

6 CONCLUSÃO

Com os resultados aqui apresentados, concluímos que o CHC causa diminuição significativa da viabilidade de células tumorais da linhagem SW756, de forma independente de e sem causar os mesmos efeitos em macrófagos, o que indica que a utilização deste inibidor nesta dose pode apresentar menos efeitos tóxicos sobre as células não tumorais do que as terapias convencionais. Além disso, o tratamento com CHC parece diminuir a morte de macrófagos e inibir parcialmente seus efeitos pró-tumorais, mostrando potencial imunomodulador. Os resultados sugerem que os efeitos observados são em decorrência da inibição do transporte de lactato, porém, mais estudos são necessários para melhor compreender este mecanismo e a colaboração da inibição do transporte de piruvato para este fenômeno.

Outra importante conclusão do trabalho é de que o cultivo de macrófagos com células tumorais causa diminuição na expressão das moléculas HLA-DR e CD86 naquelas células, um efeito que não pôde ser anulado pelo tratamento com CHC. Por fim, com base em todos os dados apresentados, nós concluímos que, apesar de ter causado o aumento da morte tumoral, o melhor cenário seja a associação de intervenções metabólicas com outras terapias, já que, além da vasta variabilidade genética, grande parte dos tumores apresenta regiões com diferentes disponibilidade de nutrientes e metabolismo e, como reforçado por este estudo, a intervenção em apenas uma via não é suficiente para eliminar o tumor e seus efeitos imunossupressores.

REFERÊNCIAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424. Epub 2018/09/13.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. Epub 2011/03/08.
3. Renner K, Singer K, Koehl GE, Geissler EK, Peter K, Siska PJ, et al. Metabolic Hallmarks of Tumor and Immune Cells in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in immunology*. 2017;8:248. Epub 2017/03/25.
4. Ganapathy V, Thangaraju M, Prasad PD. Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacology & therapeutics*. 2009;121(1):29-40. Epub 2008/11/11.
5. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309-14. Epub 1956/02/24.
6. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature reviews Drug discovery*. 2009;8(8):627-44. Epub 2009/08/01.
7. Makinoshima H, Takita M, Saruwatari K, Umemura S, Obata Y, Ishii G, et al. Signaling through the Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Axis Is Responsible for Aerobic Glycolysis mediated by Glucose Transporter in Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-mutated Lung Adenocarcinoma. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(28):17495-504. Epub 2015/05/30.
8. Hong SY, Yu FX, Luo Y, Hagen T. Oncogenic activation of the PI3K/Akt pathway promotes cellular glucose uptake by downregulating the expression of thioredoxin-interacting protein. *Cellular signalling*. 2016;28(5):377-83. Epub 2016/01/31.
9. Lien EC, Lyssiotis CA, Cantley LC. Metabolic Reprogramming by the PI3K-Akt-mTOR Pathway in Cancer. *Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer*. 2016;207:39-72. Epub 2016/08/26.
10. Deprez J, Vertommen D, Alessi DR, Hue L, Rider MH. Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(28):17269-75. Epub 1997/07/11.
11. Sun Q, Chen X, Ma J, Peng H, Wang F, Zha X, et al. Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(10):4129-34. Epub 2011/02/18.
12. Vander Heiden MG, Locasale JW, Swanson KD, Sharfi H, Heffron GJ, Amador-Noguez D, et al. Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells. *Science*. 2010;329(5998):1492-9. Epub 2010/09/18.
13. Chae YC, Vaira V, Caino MC, Tang HY, Seo JH, Kossenkov AV, et al. Mitochondrial Akt Regulation of Hypoxic Tumor Reprogramming. *Cancer cell*. 2016;30(2):257-72. Epub 2016/08/10.
14. Duvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Molecular cell*. 2010;39(2):171-83. Epub 2010/07/31.
15. Shukla SK, Gunda V, Abrego J, Haridas D, Mishra A, Soucek J, et al. MUC16-mediated activation of mTOR and c-Myc reprograms pancreatic cancer metabolism. *Oncotarget*. 2015;6(22):19118-31. Epub 2015/06/06.
16. Masui K, Tanaka K, Akhavan D, Babic I, Gini B, Matsutani T, et al. mTOR complex 2 controls glycolytic metabolism in glioblastoma through FoxO acetylation and upregulation of c-Myc. *Cell metabolism*. 2013;18(5):726-39. Epub 2013/10/22.
17. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*. 2006;441(7092):424-30. Epub 2006/05/26.
18. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*. 2006;441(7092):437-43. Epub 2006/05/26.
19. Yu L, Chen X, Sun X, Wang L, Chen S. The Glycolytic Switch in Tumors: How Many Players Are Involved? *Journal of Cancer*. 2017;8(17):3430-40. Epub 2017/11/21.
20. Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia and cancer. *J Mol Med (Berl)*. 2007;85(12):1301-7. Epub 2007/11/21.
21. Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding

- sites for hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(51):32529-37. Epub 1996/12/20.
22. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell metabolism*. 2006;3(3):177-85. Epub 2006/03/07.
23. Dang CV, Kim JW, Gao P, Yustein J. The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(1):51-6. Epub 2007/11/30.
24. Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(9):705-13. Epub 2009/01/15.
25. Kluzza J, Corazao-Rozas P, Touil Y, Jendoubi M, Maire C, Guerreschi P, et al. Inactivation of the HIF-1alpha/PDK3 signaling axis drives melanoma toward mitochondrial oxidative metabolism and potentiates the therapeutic activity of pro-oxidants. *Cancer research*. 2012;72(19):5035-47. Epub 2012/08/07.
26. Iurlaro R, Leon-Annicchiarico CL, Munoz-Pinedo C. Regulation of cancer metabolism by oncogenes and tumor suppressors. *Methods in enzymology*. 2014;542:59-80. Epub 2014/05/28.
27. Yun J, Rago C, Cheong I, Pagliarini R, Angenendt P, Rajagopalan H, et al. Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. *Science*. 2009;325(5947):1555-9. Epub 2009/08/08.
28. Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, et al. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(29):21797-800. Epub 2000/05/24.
29. Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, et al. c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(13):6658-63. Epub 1997/06/24.
30. Gan L, Xiu R, Ren P, Yue M, Su H, Guo G, et al. Metabolic targeting of oncogene MYC by selective activation of the proton-coupled monocarboxylate family of transporters. *Oncogene*. 2016;35(23):3037-48. Epub 2015/10/06.
31. Liang Y, Liu J, Feng Z. The regulation of cellular metabolism by tumor suppressor p53. *Cell & bioscience*. 2013;3(1):9. Epub 2013/02/08.
32. Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, et al. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science*. 2006;312(5780):1650-3. Epub 2006/05/27.
33. Schwartzenberg-Bar-Yoseph F, Armoni M, Karnieli E. The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer research*. 2004;64(7):2627-33. Epub 2004/04/03.
34. Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, Tanaka N. p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nature cell biology*. 2008;10(5):611-8. Epub 2008/04/09.
35. Feng Z, Hu W, de Stanchina E, Teresky AK, Jin S, Lowe S, et al. The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer research*. 2007;67(7):3043-53. Epub 2007/04/06.
36. Budanov AV, Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*. 2008;134(3):451-60. Epub 2008/08/12.
37. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism*. 2008;7(1):11-20. Epub 2008/01/08.
38. O'Neill LA, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nature reviews Immunology*. 2016;16(9):553-65. Epub 2016/07/12.
39. Sonveaux P, Vegran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(12):3930-42. Epub 2008/11/27.
40. Stone SC, Rossetti RAM, Alvarez KLF, Carvalho JP, Margarido PFR, Baracat EC, et al. Lactate secreted by cervical cancer cells modulates macrophage phenotype. *Journal of leukocyte biology*. 2019;105(5):1041-54. Epub 2019/02/28.
41. (INCA) INdCJAGdS. Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2019.
42. Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW. *World Cancer Report: cancer research for cancer prevention*. Lyon: IARC; 2020.
43. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *Jama*. 2001;286(24):3106-14. Epub 2002/01/05.

44. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology*. 1999;189(1):12-9. Epub 1999/08/19.
45. Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, et al. Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *The Journal of infectious diseases*. 1995;171(4):1026-30. Epub 1995/04/01.
46. Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, Powell K, Clayton L, Jay N, et al. The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *The Journal of pediatrics*. 1998;132(2):277-84. Epub 1998/03/20.
47. Scott M, Nakagawa M, Moscicki AB. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2001;8(2):209-20. Epub 2001/03/10.
48. Abraham AG, Strickler HD, D'Souza G. Invasive cervical cancer risk among HIV-infected women is a function of CD4 count and screening. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013;63(5):e163. Epub 2013/10/19.
49. Beskow AH, Josefsson AM, Gyllensten UB. HLA class II alleles associated with infection by HPV16 in cervical cancer in situ. *International journal of cancer*. 2001;93(6):817-22. Epub 2001/08/24.
50. Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochemical Society transactions*. 2007;35(Pt 6):1456-60. Epub 2007/11/23.
51. Human papillomaviruses. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 2007;90:1-636. Epub 2008/03/22.
52. Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
53. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*. 2008;26 Suppl 10:K1-16. Epub 2008/10/14.
54. Yang EJ, Quick MC, Hanamornroongruang S, Lai K, Doyle LA, McKeon FD, et al. Microanatomy of the cervical and anorectal squamocolumnar junctions: a proposed model for anatomical differences in HPV-related cancer risk. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2015;28(7):994-1000. Epub 2015/05/16.
55. McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. Biology of human papillomaviruses. *International journal of experimental pathology*. 2001;82(1):15-33. Epub 2001/06/26.
56. Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2005;15(5):727-46. Epub 2005/09/22.
57. Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R. 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*. 1989;63(10):4417-21. Epub 1989/10/01.
58. Boccardo E, Lepique AP, Villa LL. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2010;31(11):1905-12. Epub 2010/09/08.
59. Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *Journal of virology*. 1995;69(5):2989-97. Epub 1995/05/01.
60. McBride AA, Warburton A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS pathogens*. 2017;13(4):e1006211. Epub 2017/04/07.
61. Hazelbag S, Gorter A, Kenter GG, van den Broek L, Fleuren G. Transforming growth factor-beta1 induces tumor stroma and reduces tumor infiltrate in cervical cancer. *Human pathology*. 2002;33(12):1193-9. Epub 2003/01/07.
62. Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol*. 2007;178(5):3186-97. Epub 2007/02/22.
63. Chang YE, Laimins LA. Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. *Journal of virology*. 2000;74(9):4174-82. Epub 2001/02/07.
64. Wan F, Miao X, Quraishi I, Kennedy V, Creek KE, Pirsani L. Gene expression changes during HPV-mediated carcinogenesis: a comparison between an in vitro cell model and cervical cancer. *International journal of cancer*. 2008;123(1):32-40. Epub 2008/04/10.
65. Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion

- mechanism in cervical carcinogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(10):6764-9. Epub 2000/03/04.
66. Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes & development*. 1998;12(13):2061-72. Epub 1998/07/03.
67. Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(1):59-65. Epub 2002/03/21.
68. Scheffner M, Munger K, Byrne JC, Howley PM. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(13):5523-7. Epub 1991/07/01.
69. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature*. 2013;496(7444):238-42. Epub 2013/03/29.
70. Peng M, Yin N, Chhangawala S, Xu K, Leslie CS, Li MO. Aerobic glycolysis promotes T helper 1 cell differentiation through an epigenetic mechanism. *Science*. 2016;354(6311):481-4. Epub 2016/10/30.
71. Chang CH, Curtis JD, Maggi LB, Jr., Faubert B, Villarino AV, O'Sullivan D, et al. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell*. 2013;153(6):1239-51. Epub 2013/06/12.
72. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, et al. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(33):25130-8. Epub 2000/06/02.
73. West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature*. 2011;472(7344):476-80. Epub 2011/04/29.
74. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer research*. 2006;66(2):605-12. Epub 2006/01/21.
75. Alvarez KLF, Beldi M, Sarmanho F, Rossetti RAM, Silveira CRF, Mota GR, et al. Local and systemic immunomodulatory mechanisms triggered by Human Papillomavirus transformed cells: a potential role for G-CSF and neutrophils. *Scientific reports*. 2017;7(1):9002. Epub 2017/08/23.
76. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 2006;124(2):263-6. Epub 2006/01/28.
77. Hammes LS, Tekmal RR, Naud P, Edelweiss MI, Kirma N, Valente PT, et al. Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression--clinicopathological correlation. *Gynecologic oncology*. 2007;105(1):157-65. Epub 2007/01/19.
78. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology*. 2010;11(10):889-96. Epub 2010/09/22.
79. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(12):953-64. Epub 2005/12/03.
80. Adams DO, Hamilton TA. The cell biology of macrophage activation. *Annual review of immunology*. 1984;2:283-318. Epub 1984/01/01.
81. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of experimental medicine*. 1992;176(1):287-92. Epub 1992/07/01.
82. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*. 2002;23(11):549-55. Epub 2002/10/29.
83. Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Seminars in immunopathology*. 2013;35(5):585-600. Epub 2013/05/10.
84. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol*. 2006;177(10):7303-11. Epub 2006/11/04.
85. Loke P, Nair MG, Parkinson J, Guiliano D, Blaxter M, Allen JE. IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. *BMC immunology*. 2002;3:7. Epub 2002/07/06.
86. Heusinkveld M, de Vos van Steenwijk PJ, Goedemans R, Ramwadhoebe TH, Gorter A, Welters MJ, et al. M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells. *J Immunol*. 2011;187(3):1157-65. Epub 2011/06/29.

87. Roca H, Varsos ZS, Sud S, Craig MJ, Ying C, Pienta KJ. CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(49):34342-54. Epub 2009/10/17.
88. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*. 2004;25(12):677-86. Epub 2004/11/09.
89. Akiyama SK, Yamada SS, Yamada KM. Analysis of the role of glycosylation of the human fibronectin receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264(30):18011-8. Epub 1989/10/25.
90. Adurthi S, Mukherjee G, Krishnamurthy H, Sudhir K, Bafna UD, Umadevi K, et al. Functional tumor infiltrating TH1 and TH2 effectors in large early-stage cervical cancer are suppressed by regulatory T cells. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2012;22(7):1130-7. Epub 2012/08/09.
91. Biswas SK, Mantovani A. Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell metabolism*. 2012;15(4):432-7. Epub 2012/04/10.
92. Rodriguez-Prados JC, Traves PG, Cuenca J, Rico D, Aragonés J, Martín-Sanz P, et al. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *J Immunol*. 2010;185(1):605-14. Epub 2010/05/26.
93. Mills EL, O'Neill LA. Reprogramming mitochondrial metabolism in macrophages as an anti-inflammatory signal. *European journal of immunology*. 2016;46(1):13-21. Epub 2015/12/09.
94. Forman HJ, Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;166(12 Pt 2):S4-8. Epub 2002/12/10.
95. Oren R, Farnham AE, Saito K, Milofsky E, Karnovsky ML. Metabolic patterns in three types of phagocytizing cells. *The Journal of cell biology*. 1963;17:487-501. Epub 1963/06/01.
96. Schnyder J, Baggiolini M. Role of phagocytosis in the activation of macrophages. *The Journal of experimental medicine*. 1978;148(6):1449-57. Epub 1978/12/01.
97. Maeng O, Kim YC, Shin HJ, Lee JO, Huh TL, Kang KI, et al. Cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase protects macrophages from LPS-induced nitric oxide and reactive oxygen species. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;317(2):558-64. Epub 2004/04/06.
98. Odegaard JI, Chawla A. Alternative macrophage activation and metabolism. *Annual review of pathology*. 2011;6:275-97. Epub 2010/11/03.
99. Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol*. 2008;180(4):2011-7. Epub 2008/02/06.
100. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(1):175-84. Epub 2007/01/04.
101. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*. 2007;317(5838):666-70. Epub 2007/08/04.
102. Chittechath M, Dhillon MK, Lim JY, Laoui D, Shalova IN, Teo YL, et al. Molecular profiling reveals a tumor-promoting phenotype of monocytes and macrophages in human cancer progression. *Immunity*. 2014;41(5):815-29. Epub 2014/12/03.
103. Vitale I, Manic G, Coussens LM, Kroemer G, Galluzzi L. Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment. *Cell metabolism*. 2019;30(1):36-50. Epub 2019/07/04.
104. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nature reviews Clinical oncology*. 2017;14(7):399-416. Epub 2017/01/25.
105. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39-51. Epub 2010/04/08.
106. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(4):253-68. Epub 2012/03/23.
107. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunology today*. 1992;13(7):265-70. Epub 1992/07/01.
108. Gocheva V, Wang HW, Gadea BB, Shree T, Hunter KE, Garfall AL, et al. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes & development*. 2010;24(3):241-55. Epub 2010/01/19.
109. Wang R, Zhang J, Chen S, Lu M, Luo X, Yao S, et al. Tumor-associated macrophages provide a suitable microenvironment for non-small lung cancer invasion and progression. *Lung Cancer*. 2011;74(2):188-96. Epub 2011/05/24.
110. Kryczek I, Wei S, Zou L, Zhu G, Mottram P, Xu H, et al. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J Immunol*. 2006;177(1):40-4. Epub 2006/06/21.

111. Miller A, Nagy C, Knapp B, Laengle J, Ponweiser E, Groeger M, et al. Exploring Metabolic Configurations of Single Cells within Complex Tissue Microenvironments. *Cell metabolism*. 2017;26(5):788-800 e6. Epub 2017/09/12.
112. Muller S, Kohanbash G, Liu SJ, Alvarado B, Carrera D, Bhaduri A, et al. Single-cell profiling of human gliomas reveals macrophage ontogeny as a basis for regional differences in macrophage activation in the tumor microenvironment. *Genome biology*. 2017;18(1):234. Epub 2017/12/22.
113. Wenes M, Shang M, Di Matteo M, Goveia J, Martin-Perez R, Serneels J, et al. Macrophage Metabolism Controls Tumor Blood Vessel Morphogenesis and Metastasis. *Cell metabolism*. 2016;24(5):701-15. Epub 2016/10/25.
114. Liu D, Chang C, Lu N, Wang X, Lu Q, Ren X, et al. Comprehensive Proteomics Analysis Reveals Metabolic Reprogramming of Tumor-Associated Macrophages Stimulated by the Tumor Microenvironment. *Journal of proteome research*. 2017;16(1):288-97. Epub 2016/11/05.
115. Arts RJ, Plantinga TS, Tuit S, Ulas T, Heinhuis B, Tesselaar M, et al. Transcriptional and metabolic reprogramming induce an inflammatory phenotype in non-medullary thyroid carcinoma-induced macrophages. *Oncoimmunology*. 2016;5(12):e1229725. Epub 2017/01/27.
116. Lepique AP, Daghestanli KR, Cuccovia IM, Villa LL. HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(13):4391-400. Epub 2009/06/25.
117. Petrillo M, Zannoni GF, Martinelli E, Pedone Anchora L, Ferrandina G, Tropeano G, et al. Polarisation of Tumor-Associated Macrophages toward M2 Phenotype Correlates with Poor Response to Chemoradiation and Reduced Survival in Patients with Locally Advanced Cervical Cancer. *PloS one*. 2015;10(9):e0136654. Epub 2015/09/04.
118. Chang CH, Qiu J, O'Sullivan D, Buck MD, Noguchi T, Curtis JD, et al. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell*. 2015;162(6):1229-41. Epub 2015/09/01.
119. Halestrap AP, Wilson MC. The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB life*. 2012;64(2):109-19. Epub 2011/12/14.
120. Dawson DM, Goodfriend TL, Kaplan NO. Lactic Dehydrogenases: Functions of the Two Types Rates of Synthesis of the Two Major Forms Can Be Correlated with Metabolic Differentiation. *Science*. 1964;143(3609):929-33. Epub 1964/02/28.
121. Doherty JR, Cleveland JL. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(9):3685-92. Epub 2013/09/04.
122. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. 2008;134(5):703-7. Epub 2008/09/09.
123. Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*. 2014;513(7519):559-63. Epub 2014/07/22.
124. Loike JD, Kaback E, Silverstein SC, Steinberg TH. Lactate transport in macrophages. *J Immunol*. 1993;150(5):1951-8. Epub 1993/03/01.
125. Hui S, Ghergurovich JM, Morscher RJ, Jang C, Teng X, Lu W, et al. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. *Nature*. 2017;551(7678):115-8. Epub 2017/10/19.
126. Husain Z, Huang Y, Seth P, Sukhatme VP. Tumor-derived lactate modifies antitumor immune response: effect on myeloid-derived suppressor cells and NK cells. *J Immunol*. 2013;191(3):1486-95. Epub 2013/07/03.
127. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*. 2007;109(9):3812-9. Epub 2007/01/27.
128. Brand A, Singer K, Koehl GE, Kolitzus M, Schoenhammer G, Thiel A, et al. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell metabolism*. 2016;24(5):657-71. Epub 2016/09/20.
129. Selleri S, Bifsha P, Civini S, Pacelli C, Dieng MM, Lemieux W, et al. Human mesenchymal stromal cell-secreted lactate induces M2-macrophage differentiation by metabolic reprogramming. *Oncotarget*. 2016;7(21):30193-210. Epub 2016/04/14.
130. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Ferreira L, Pereira SM, Etlinger D, Moreira MA, et al. Increasing expression of monocarboxylate transporters 1 and 4 along progression to invasive cervical carcinoma. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2008;27(4):568-74. Epub 2008/08/30.
131. Ratter JM, Rooijackers HMM, Hooiveld GJ, Hijmans AGM, de Galan BE, Tack CJ, et al. In vitro and in vivo Effects of Lactate on Metabolism and Cytokine Production of Human Primary PBMCs and Monocytes. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2564. Epub 2018/11/30.

132. Hoque R, Farooq A, Ghani A, Gorelick F, Mehal WZ. Lactate reduces liver and pancreatic injury in Toll-like receptor- and inflammasome-mediated inflammation via GPR81-mediated suppression of innate immunity. *Gastroenterology*. 2014;146(7):1763-74. Epub 2014/03/25.
133. Chen P, Zuo H, Xiong H, Kolar MJ, Chu Q, Saghatelian A, et al. Gpr132 sensing of lactate mediates tumor-macrophage interplay to promote breast cancer metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(3):580-5. Epub 2017/01/05.
134. Bohn T, Rapp S, Luther N, Klein M, Bruehl TJ, Kojima N, et al. Tumor immunoevasion via acidosis-dependent induction of regulatory tumor-associated macrophages. *Nature immunology*. 2018;19(12):1319-29. Epub 2018/11/07.
135. Errea A, Cayet D, Marchetti P, Tang C, Kluza J, Offermanns S, et al. Lactate Inhibits the Pro-Inflammatory Response and Metabolic Reprogramming in Murine Macrophages in a GPR81-Independent Manner. *PloS one*. 2016;11(11):e0163694. Epub 2016/11/16.
136. Broer S, Schneider HP, Broer A, Rahman B, Hamprecht B, Deitmer JW. Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes by changes in cytosolic pH. *The Biochemical journal*. 1998;333 (Pt 1):167-74. Epub 1998/06/26.
137. Dimmer KS, Friedrich B, Lang F, Deitmer JW, Broer S. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *The Biochemical journal*. 2000;350 Pt 1:219-27. Epub 2000/08/06.
138. Halestrap AP, Meredith D. The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2004;447(5):619-28. Epub 2003/05/10.
139. Halestrap AP. Monocarboxylate transporter 1. UCSD-Nature Signaling Gateway Molecule Page. 2009:A001490.
140. Hahn EL, Halestrap AP, Gamelli RL. Expression of the lactate transporter MCT1 in macrophages. *Shock*. 2000;13(4):253-60. Epub 2000/04/25.
141. Payen VL, Mina E, Van Hee VF, Porporato PE, Sonveaux P. Monocarboxylate transporters in cancer. *Molecular metabolism*. 2020;33:48-66. Epub 2019/08/10.
142. Baek G, Tse YF, Hu Z, Cox D, Buboltz N, McCue P, et al. MCT4 defines a glycolytic subtype of pancreatic cancer with poor prognosis and unique metabolic dependencies. *Cell reports*. 2014;9(6):2233-49. Epub 2014/12/17.
143. de la Cruz-Lopez KG, Castro-Munoz LJ, Reyes-Hernandez DO, Garcia-Carranca A, Manzo-Merino J. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Frontiers in oncology*. 2019;9:1143. Epub 2019/11/19.
144. Tan Z, Xie N, Banerjee S, Cui H, Fu M, Thannickal VJ, et al. The monocarboxylate transporter 4 is required for glycolytic reprogramming and inflammatory response in macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(1):46-55. Epub 2014/11/20.
145. Sborov DW, Haverkos BM, Harris PJ. Investigational cancer drugs targeting cell metabolism in clinical development. *Expert opinion on investigational drugs*. 2015;24(1):79-94. Epub 2014/09/17.
146. Manning Fox JE, Meredith D, Halestrap AP. Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. *The Journal of physiology*. 2000;529 Pt 2:285-93. Epub 2000/12/02.
147. Curtis NJ, Mooney L, Hopcroft L, Michopoulos F, Whalley N, Zhong H, et al. Pre-clinical pharmacology of AZD3965, a selective inhibitor of MCT1: DLBCL, NHL and Burkitt's lymphoma anti-tumor activity. *Oncotarget*. 2017;8(41):69219-36. Epub 2017/10/21.
148. Riffle S, Hegde RS. Modeling tumor cell adaptations to hypoxia in multicellular tumor spheroids. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2017;36(1):102. Epub 2017/08/05.
149. Mori S, Chang JT, Andrechek ER, Matsumura N, Baba T, Yao G, et al. Anchorage-independent cell growth signature identifies tumors with metastatic potential. *Oncogene*. 2009;28(31):2796-805. Epub 2009/06/02.
150. Hong CS, Graham NA, Gu W, Espindola Camacho C, Mah V, Maresh EL, et al. MCT1 Modulates Cancer Cell Pyruvate Export and Growth of Tumors that Co-express MCT1 and MCT4. *Cell reports*. 2016;14(7):1590-601. Epub 2016/02/16.
151. Bola BM, Chadwick AL, Michopoulos F, Blount KG, Telfer BA, Williams KJ, et al. Inhibition of monocarboxylate transporter-1 (MCT1) by AZD3965 enhances radiosensitivity by reducing lactate transport. *Molecular cancer therapeutics*. 2014;13(12):2805-16. Epub 2014/10/05.

152. Polanski R, Hodgkinson CL, Fusi A, Nonaka D, Priest L, Kelly P, et al. Activity of the monocarboxylate transporter 1 inhibitor AZD3965 in small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20(4):926-37. Epub 2013/11/28.
153. Belouèche-Babari M, Wantuch S, Casals Galobart T, Koniordou M, Parkes HG, Arunan V, et al. MCT1 Inhibitor AZD3965 Increases Mitochondrial Metabolism, Facilitating Combination Therapy and Noninvasive Magnetic Resonance Spectroscopy. *Cancer research*. 2017;77(21):5913-24. Epub 2017/09/20.
154. Gordon KM, Duckett L, Daul B, Petrie HT. A simple method for detecting up to five immunofluorescent parameters together with DNA staining for cell cycle or viability on a benchtop flow cytometer. *Journal of immunological methods*. 2003;275(1-2):113-21. Epub 2003/04/02.
155. Zimmermann M, Meyer N. Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. *Methods Mol Biol*. 2011;740:57-63. Epub 2011/04/07.
156. Sawai H, Domae N. Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;411(3):569-73. Epub 2011/07/19.
157. Lee LK, Gibson FM. Early Apoptotic Cells Detected by 7-Aminoactinomycin and Annexin V Are Positive for Fluorescence Tagged Activated Caspase-9 Inhibitor (Red-LEHD-FMK). *Blood*. 2008;112(11):4728-.
158. Saccani A, Schioppa T, Porta C, Biswas SK, Nebuloni M, Vago L, et al. p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer research*. 2006;66(23):11432-40. Epub 2006/12/06.
159. Stout RD, Watkins SK, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages. *Journal of leukocyte biology*. 2009;86(5):1105-9. Epub 2009/07/17.
160. Duluc D, Corvaisier M, Blanchard S, Catala L, Descamps P, Gamelin E, et al. Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. *International journal of cancer*. 2009;125(2):367-73. Epub 2009/04/21.
161. Guiducci C, Vicari AP, Sangaletti S, Trinchieri G, Colombo MP. Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. *Cancer research*. 2005;65(8):3437-46. Epub 2005/04/19.
162. Colen CB, Shen Y, Ghoddoussi F, Yu P, Francis TB, Koch BJ, et al. Metabolic targeting of lactate efflux by malignant glioma inhibits invasiveness and induces necrosis: an in vivo study. *Neoplasia*. 2011;13(7):620-32. Epub 2011/07/14.
163. Kim HS, Masko EM, Poulton SL, Kennedy KM, Pizzo SV, Dewhirst MW, et al. Carbohydrate restriction and lactate transporter inhibition in a mouse xenograft model of human prostate cancer. *BJU international*. 2012;110(7):1062-9. Epub 2012/03/08.
164. Freedman RS, Bowen JM, Leibovitz A, Pathak S, Siciliano MJ, Gallager HS, et al. Characterization of a cell line (SW756) derived from a human squamous carcinoma of the uterine cervix. *In vitro*. 1982;18(8):719-26. Epub 1982/08/01.
165. Colen CB, Seraji-Bozorgzad N, Marples B, Galloway MP, Sloan AE, Mathupala SP. Metabolic remodeling of malignant gliomas for enhanced sensitization during radiotherapy: an in vitro study. *Neurosurgery*. 2006;59(6):1313-23; discussion 23-4. Epub 2007/02/06.
166. Vegran F, Boidot R, Michiels C, Sonveaux P, Feron O. Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF-kappaB/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. *Cancer research*. 2011;71(7):2550-60. Epub 2011/02/09.
167. Sonveaux P, Copetti T, De Saedeleer CJ, Vegran F, Verrax J, Kennedy KM, et al. Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. *PLoS one*. 2012;7(3):e33418. Epub 2012/03/20.
168. Kaushik DK, Bhattacharya A, Mirzaei R, Rawji KS, Ahn Y, Rho JM, et al. Enhanced glycolytic metabolism supports transmigration of brain-infiltrating macrophages in multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 2019;129(8):3277-92. Epub 2019/05/22.
169. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516. Epub 2007/06/15.
170. McCullough KC, Basta S, Knotig S, Gerber H, Schaffner R, Kim YB, et al. Intermediate stages in monocyte-macrophage differentiation modulate phenotype and susceptibility to virus infection. *Immunology*. 1999;98(2):203-12. Epub 1999/12/14.
171. Menck K, Behme D, Pantke M, Reiling N, Binder C, Pukrop T, et al. Isolation of human monocytes by double gradient centrifugation and their differentiation to macrophages in teflon-coated cell culture bags. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2014(91):e51554. Epub 2014/09/17.

172. Patel AA, Zhang Y, Fullerton JN, Boelen L, Rongvaux A, Maini AA, et al. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2017;214(7):1913-23. Epub 2017/06/14.
173. Frankenberger M, Menzel M, Betz R, Kassner G, Weber N, Kohlhauf M, et al. Characterization of a population of small macrophages in induced sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy volunteers. *Clinical and experimental immunology*. 2004;138(3):507-16. Epub 2004/11/17.
174. Dewhurst JA, Lea S, Hardaker E, Dungwa JV, Ravi AK, Singh D. Characterisation of lung macrophage subpopulations in COPD patients and controls. *Scientific reports*. 2017;7(1):7143. Epub 2017/08/05.
175. Safi W, Kuehn A, Nussler A, Eckstein HH, Pelisek J. Differentiation of human CD14+ monocytes: an experimental investigation of the optimal culture medium and evidence of a lack of differentiation along the endothelial line. *Experimental & molecular medicine*. 2016;48:e227. Epub 2016/04/16.
176. Lee KW, Lee Y, Kim DS, Kwon HJ. Direct role of NF-kappaB activation in Toll-like receptor-triggered HLA-DRA expression. *European journal of immunology*. 2006;36(5):1254-66. Epub 2006/04/19.
177. Zou GM, Hu WY. LIGHT regulates CD86 expression on dendritic cells through NF-kappaB, but not JNK/AP-1 signal transduction pathway. *Journal of cellular physiology*. 2005;205(3):437-43. Epub 2005/05/17.
178. Ade N, Antonios D, Kerdine-Romer S, Boislevé F, Rousset F, Pallardy M. NF-kappaB plays a major role in the maturation of human dendritic cells induced by NiSO(4) but not by DNCB. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2007;99(2):488-501. Epub 2007/07/20.
179. Stone SC, Rossetti RA, Bolpetti A, Boccardo E, Souza PS, Lepique AP. HPV16-associated tumors control myeloid cell homeostasis in lymphoid organs, generating a suppressor environment for T cells. *Journal of leukocyte biology*. 2014;96(4):619-31. Epub 2014/06/28.
180. Andreesen R, Brugger W, Scheibenbogen C, Kreutz M, Leser HG, Rehm A, et al. Surface phenotype analysis of human monocyte to macrophage maturation. *Journal of leukocyte biology*. 1990;47(6):490-7. Epub 1990/06/01.
181. Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunology today*. 1993;14(3):121-5. Epub 1993/03/01.
182. Jacob SS, Shastry P, Sudhakaran PR. Monocyte-macrophage differentiation in vitro: modulation by extracellular matrix protein substratum. *Molecular and cellular biochemistry*. 2002;233(1-2):9-17. Epub 2002/06/27.
183. Ohradanova-Repic A, Machacek C, Fischer MB, Stockinger H. Differentiation of human monocytes and derived subsets of macrophages and dendritic cells by the HLDA10 monoclonal antibody panel. *Clinical & translational immunology*. 2016;5(1):e55. Epub 2016/02/24.
184. Landmann R, Ludwig C, Obrist R, Obrecht JP. Effect of cytokines and lipopolysaccharide on CD14 antigen expression in human monocytes and macrophages. *Journal of cellular biochemistry*. 1991;47(4):317-29. Epub 1991/12/01.
185. Rey-Giraud F, Hafner M, Ries CH. In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS one*. 2012;7(8):e42656. Epub 2012/08/11.
186. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:453-61. Epub 2007/11/06.
187. Benner B, Scarberry L, Suarez-Kelly LP, Duggan MC, Campbell AR, Smith E, et al. Generation of monocyte-derived tumor-associated macrophages using tumor-conditioned media provides a novel method to study tumor-associated macrophages in vitro. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2019;7(1):140. Epub 2019/05/30.
188. Perera LP, Waldmann TA. Activation of human monocytes induces differential resistance to apoptosis with rapid down regulation of caspase-8/FLICE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(24):14308-13. Epub 1998/11/25.
189. Halestrap AP, Denton RM. Specific inhibition of pyruvate transport in rat liver mitochondria and human erythrocytes by alpha-cyano-4-hydroxycinnamate. *The Biochemical journal*. 1974;138(2):313-6. Epub 1974/02/01.
190. Halestrap AP. The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors. *The Biochemical journal*. 1975;148(1):85-96. Epub 1975/04/01.
191. Halestrap AP, Denton RM. The specificity and metabolic implications of the inhibition of pyruvate transport in isolated mitochondria and intact tissue preparations by alpha-Cyano-4-hydroxycinnamate and related compounds. *The Biochemical journal*. 1975;148(1):97-106. Epub 1975/04/01.
192. Halestrap AP. The mechanism of the inhibition of the mitochondrial pyruvate transport by alpha-cyanocinnamate derivatives. *The Biochemical journal*. 1976;156(1):181-3. Epub 1976/04/15.

193. Diers AR, Broniowska KA, Chang CF, Hogg N. Pyruvate fuels mitochondrial respiration and proliferation of breast cancer cells: effect of monocarboxylate transporter inhibition. *The Biochemical journal*. 2012;444(3):561-71. Epub 2012/03/31.
194. Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, Lopez M, et al. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(19):8788-93. Epub 2010/04/28.
195. Pike LS, Smift AL, Croteau NJ, Ferrick DA, Wu M. Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1807(6):726-34. Epub 2011/06/22.
196. Aires CC, Soveral G, Luis PB, ten Brink HJ, de Almeida IT, Duran M, et al. Pyruvate uptake is inhibited by valproic acid and metabolites in mitochondrial membranes. *FEBS letters*. 2008;582(23-24):3359-66. Epub 2008/09/09.