

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

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.

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, facilitado 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.

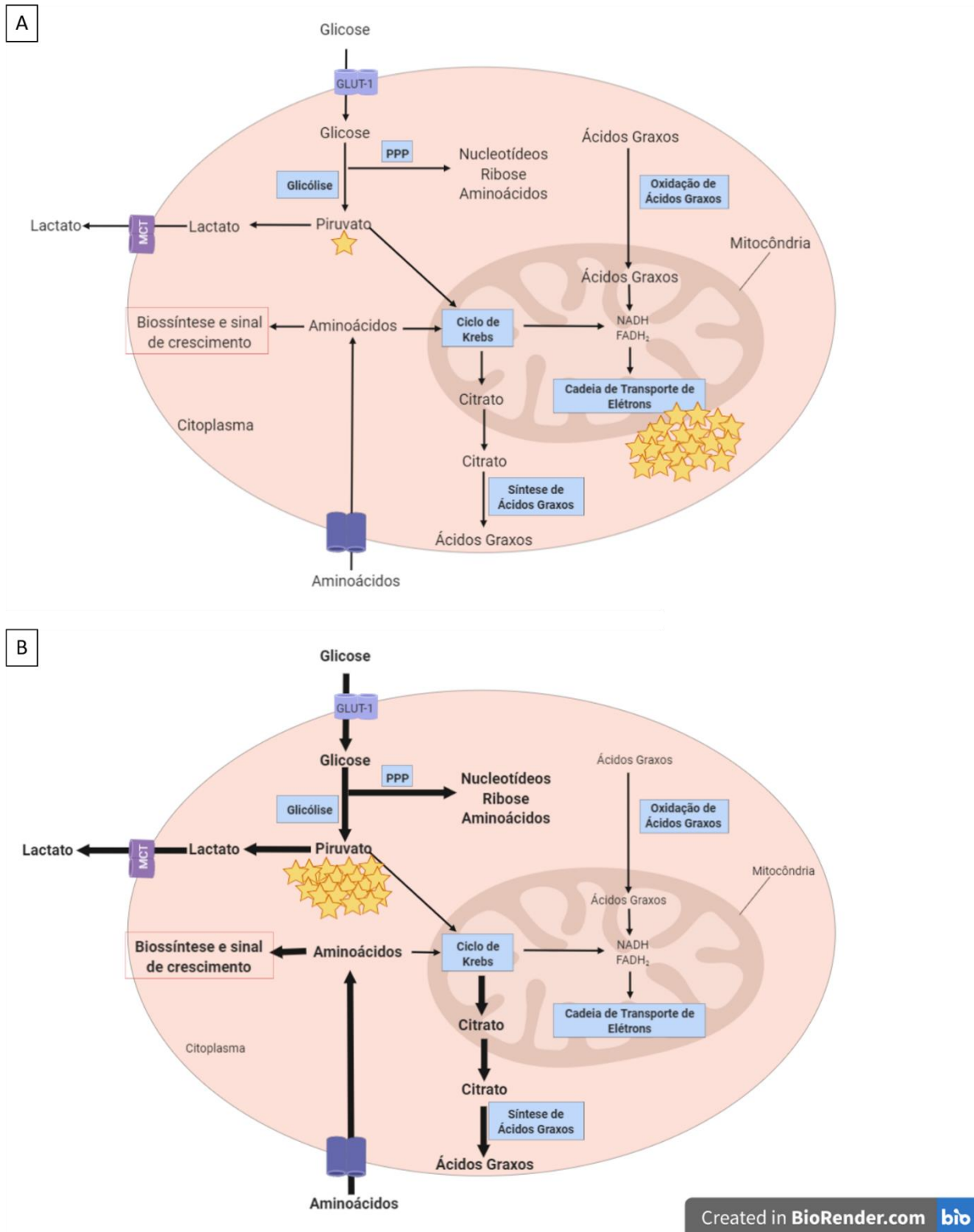


Figura 1. Resumo das principais vias metabólicas em células humanas e representação das vias favorecidas em células tumorais.

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 efectoras, 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 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, Daghanli 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. *Pflügers 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.