Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Natália Mesquita de Brito

Análise do perfil metabólico de macrófagos associados ao tumor: efeito das lipoxinas

Rio de Janeiro
2019

Natália Mesquita de Brito

Análise do perfil metabólico de macrófagos associados ao tumor: efeito das lipoxinas

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Loureiro Simões

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

B862 Brito, Natália Mesquita de.
Análise do perfil metabólico de macrófagos associados ao tumor: efeito das lipoxinas / Natalia Mesquita de Brito. – 2019.
124 f.

Orientadora: Thereza Christina Barja-Fidalgo
Coorientador: Rafael Loureiro Simões

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Lipoxinas – Teses. 2. Macrófagos - Teses. 3. Inflamação - Teses. 4. Tumores - Teses. 5. Neoplasias – Teses. I. Fidalgo, Thereza Christina Barja. II. Simões, Rafael Loureiro. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

..... CDU 616-006.8

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Natália Mesquita de Brito

Análise do perfil metabólico de macrófagos associados ao tumor: efeito das lipoxinas

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 5 de abril de 2019.

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Loureiro Simões

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof.ª Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Prof. Dr. André Luiz Mencalha

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Prof.ª Dra. Adriane Regina Todeschini

Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os professores que já tive e que, de alguma forma, me ajudaram a chegar até onde estou hoje.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rodrigo e Patricia, por toda ajuda, confiança e apoio desde sempre. Nada seria possível sem vocês.

Ao meu irmão, com quem sei que posso sempre contar. Muito obrigada por sempre estar disposto a me ajudar.

Ao meu namorado, por toda paciência e carinho despendidos a mim nestes quase 4 anos.

À Prof[a]. Dra. Christina Barja-Fidalgo, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por toda atenção e confiança a mim concedida.

Ao Prof. Dr. Rafael Simões, por sempre acreditar no meu potencial, me orientando desde a iniciação científica, sempre com muita paciência, atenção e incentivo. Muito obrigada por se fazer sempre disponível, me ouvindo, ajudando e aconselhando no que fosse preciso.

Às companheiras de pesquisa, Julia e Hayandra por todos os bons momentos divididos e por sempre estarem dispostas a ajudar, se tornando fundamentais para a realização deste trabalho.

Às Prof[as] Simone Vargas e Roberta Gama, por estarem sempre dispostas a me ajudar e aconselhar dentro e fora da ciência. Muito obrigada pela amizade, vocês foram fundamentais para o meu desenvolvimento científico e pessoal nestes 4 anos de doutorado.

Ao Prof. Dr. Anibal Vercesi (UNICAMP) por abrir as portas de seu laboratório para a realização de ensaios indispensáveis para o projeto, e ao Gabriel por toda atenção e ajuda na coleta e análise dos dados.

Ao Prof. Dr. Heitor Affonso por toda ajuda durante esses 4 anos de doutorado, por sempre estar disposto a discutir meus dados e pela excelente revisão deste trabalho.

Aos amigos de laboratório, pelos melhores momentos de descontração, sempre tornando o laboratório um ótimo ambiente de se trabalhar.

Aos técnicos/amigos do laboratório, Gabrielle e Genilson, indispensáveis para realização de qualquer projeto. Muito obrigada pelo trabalho muito bem feito.

Finalmente, agradeço ao CNPQ, CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro concedido.

A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo

Nelson Mandela

RESUMO

BRITO, Natália Mesquita de. *Análise do perfil metabólico de macrófagos associados ao tumor:* efeito das lipoxinas. 2019. 124f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

No microambiente tumoral, a infiltração de células do sistema imunológico, como os macrófagos, pode promover ou inibir o desenvolvimento do câncer. A ativação diferencial de macrófagos é sustentada criticamente por alterações metabólicas intracelulares. Os macrófagos pró-inflamatórios M1 têm um perfil altamente glicolítico e apresentam um alto fluxo pela a via pentoses fosfato (PPP), apoiando suas funções citotóxicas. Por outro lado, os macrófagos M2 anti-inflamatórios dependem do metabolismo oxidativo. Os TAMs (macrófagos associados a tumores; do inglês *tumor associated macrophages*) desempenham um papel dominante como orquestradores da inflamação relacionada ao câncer, mas pouco se sabe sobre seu metabolismo. Em estudos anteriores, nosso grupo observou que as lipoxinas, mediadores pró-resolutivos, induzem a mudança do perfil de M2-*like* dos TAMs para um perfil semelhante ao M1, aumentando a produção de ROS e NO, prejudicando a progressão do tumor. Portanto, o objetivo deste estudo foi elucidar o perfil e as exigências metabólicas de TAMs, e analisar os efeitos da lipoxina sobre o metabolismo destas células. Para obtenção dos TAMs, macrófagos derivados de monócitos humanos foram estimulados e diferenciados à TAM com o meio condicionado de células tumorais MV3 (linhagem celular de melanoma humano). Estes TAMs, diferentemente dos macrófagos M2 clássicos (diferenciados pelo tratamento com IL-4), apresentaram alta atividade glicolítica, consumindo e secretando altos níveis de glicose e lactato, respectivamente. Além disso, essas células exibiram alta atividade da via mTOR / Akt e aumento na expressão de GLUT-1 e da enzima hexoquinase-2, além de apresentaram alta respiração mitocondrial e baixa absorção de ácidos graxos exógenos. Observamos ainda que a inibição da via glicolítica, mas não a inibição da fosforilação oxidativa ou da PPP, levou à diminuição da porcentagem de células positivas para marcadores M2 nos TAMs. Por outro lado, quando a PPP foi inibida, a lipoxina foi incapaz de restaurar as propriedades citotóxicas dos TAMs sobre as células tumorais, tais como a produção de ROS e NO. Em conjunto, nossos dados sugerem que os TAMs, embora se apresentem com perfil semelhante ao de macrófagos M2, diferentemente destes, dependem do metabolismo glicolítico para manter seu fenótipo e suportar suas funções. Mostramos ainda que o efeito da lipoxina, modificando o perfil funcional e fenotípico dos TAMs parece envolver um redirecionamento do metabolismo dessas células, desviando o fluxo para a via das PPP e assim aumentando sua atividade anti-tumoral.

Palavras-chave: Câncer. Macrófagos associados ao tumor. Inflamação. Metabolismo. Lipoxina.

ABSTRACT

BRITO, Natália Mesquita de. *Analysis of the metabolic profile of tumor-associated macrophages:* effects of lipoxins*.* 2019. 124f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

In the tumor microenvironment, the infiltration of cells of the immune system, such as macrophages, may promote or inhibit the development of cancer. Differential activation of macrophages is critically supported by intracellular metabolic changes. M1 proinflammatory macrophages are highly glycolytic and present flux through the phosphate pentose pathway (PPP), which support their proliferative and cytotoxic functions. On the other hand, anti-inflammatory M2 macrophages depend on oxidative metabolism. TAMs (tumor-associated macrophages) play a dominant role as orchestrators of cancer-related inflammation, but little is known about their metabolism. In previous studies, our group observed that lipoxins, pro-resolutive mediators, induce a change in the M2-like profile of TAMs to a M1-like profile, increasing ROS and NO production and impairing tumor progression. Therefore, the purpose of this study was to elucidate the profile and metabolic requirements of TAMs and analyze the effects of lipoxin on its metabolic pathways. To obtain TAMs, human monocytes-derived macrophages were stimulated with MV3 (human melanoma cell line) conditioned medium. These TAMs, unlike the classic M2 macrophages (IL-4 stimulation), presented high glycolytic activity, consuming and secreting high levels of glucose and lactate, respectively. In addition, these cells exhibited high activity of the mTOR / Akt pathway and increased expression of GLUT-1 and the hexokinase-2 enzyme, in addition to high mitochondrial respiration and low absorption of exogenous fatty acids. We also observed that inhibition of the glycolytic pathway, but not the inhibition of oxidative phosphorylation or PPP, led to a decrease in the percentage of cells positive for M2 markers in TAMs. On the other hand, when PPP was inhibited, lipoxin was unable to restore the cytotoxic properties of TAMs on tumor cells, such as ROS and NO production. Taken together, our data suggest that TAMs, although generally considered M2-like macrophages, differently from these, rely on glycolytic metabolism to maintain their phenotype and functions. We also show that the effect of lipoxin, modifying the functional and phenotypic profile of TAMs, seems to involve a redirection of the metabolism of these cells, diverting the flow to the PPP pathway and thus increasing its anti-tumor activity.

Keywords: Cancer. Tumor-associated macrophages. Inflammation. Metabolism. Lipoxin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Principais causas do Câncer 17
Figura 2 - Alterações fundamentais que levam à malignidade 18
Tabela 1 - Estimativa do número de casos novos de câncer no Brasil 20
Figura 3 – Via Glicolítica.....22
Figura 4 – Cadeia de Transporte de Elétrons 24
Figura 5 - Microambiente Tumoral 28
Figura 6 - Ciclo do Ácido Cítrico 32
Figura 7 - Glicólise e reações oxidativas e não oxidativas da PPP 35
Figura 8 - Biossíntese das Lipoxinas e “aspirin-triggered-lipoxins” (ATL) 43
Figura 9 - Estratégias utilizadas para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo 51
Figura 10 - TAMs apresentam alta expressão de marcadores M2 e baixa expressão de marcadores M1 61
Figura 11 - TAMs apresentam alta atividade glicolítica (continua) 63
Figura 12 - TAMs apresentam alta ativação da via Akt/mTOR..... 66
Figura 13 - TAMs apresentam alta fosforilação oxidativa (continua)..... 68
Figura 14 - TAMs apresentam baixa captação de ácidos graxos 71
Figura 15 - A inibição da via glicolítica altera o fenótipo M2 dos TAMs (continua) 73
Figura 16 - A inibição da fosforilação oxidativa não altera o fenótipo dos TAMs.....76
Figura 17 - A inibição da via das pentoses fosfato não altera o fenótipo dos TAMs (continua) 79
Figura 18 - O tratamento com ATL não altera o metabolismo glicolítico dos TAMs (continua) 82
Figura 19 - O tratamento com ATL induz a forma monomérica da PKM2 e sua translocação para o núcleo (continua) 85
Figura 20 - O tratamento com ATL não altera o metabolismo oxidativo dos TAMs 88
Figura 21 - O tratamento com ATL induz um aumento na captação de ácidos graxos 90

Figura 22 - A inibição da via glicolítica não interfere no efeito do ATL sobre os TAMs 92
Figura 23 - O efeito do ATL sobre os TAMs é dependente da ativação da via das pentoses fosfato (continua) 94
Figura 24 - A ativação da via das pentoses induzida pelo ATL em TAMs é capaz de restaurar suas propriedades citotóxicas e levar a morte de células tumorais..... 97
Figura 25 – A restauração da citotoxidade induzida pelo ATL nos TAMs é independente da quebra do citrato citosólico 99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-DG	2-deoxi-D-glicose
6-NA	6-aminonicotinamida
6PG	6-fosfogliconato
6PGDH	6-fosfogluconato desidrogenase
6PGL	6-fosfogluconolactonase
AA	ácido araquidônico
ACC	acetil-coa carboxilase
ACLY	*ATP citrate lyase* (ATP citrato liase)
AKT	proteína quinase B
AMP	adenosina monofosfato
AMPK	*AMP-activated protein kinase* (quinase ativada por AMP)
ANXA	anexina A
APC	aloficocianina
ATL	a*spirin triggered lipoxins* (lipoxina-induzidas por aspirina)
BSA	*bovine serum albumin* (albumina do soro bovino)
CAF	*cancer-associated fibroblast* (fibroblasto associado ao tumor)
CARKL	*carbohydrate kinase-like protein* (proteína tipo carboidrato quinase)
CCL	*chemokine (C-C motif) ligand* (ligante de quimiocina)
CIC	*mitochondrial citrate carrier* (carreagor de citrato mitocondrial)
CMFDA	*5-chloromethylfluorescein diacetate* (5-clorometilfluoresceina diacetato)
CoA	coenzima A
COX	ciclooxigenase
CPT	carnitina palmitoiltranferase
CSF	*macrophage colony-stimulating* factor (fator estimulador de colônia de macrófagos)
DSS	*disuccinimidyl suberate* (suberato dissucinimidílico)
E4P	eritrose-4-fosfato
ECL	*enhanced chemiluminescence* (quimioluminescência aumentada)

EDTA	*ethylenediaminetetraacetic acid* (ácido etileno diamina tetra-acético)
ERK	*extracellular signal-regulated kinases* (quinase regulada por sinal extracelular)
F6P	frutose-6-fosfato
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FBP	frutose-1,6-bifosfato
FCCP	fluorocarbonil-cianeto fenilhidrazona
FPR	*formyl peptide receptor* (receptor para peptídeo formilados)
G3P	gliceraldeído-3-fosfato
G6PD	glicose-6-fosfato desidrogenase
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GC	glicocorticóides
G-CSF	*Granulocyte colony-stimulating fator* (fator estimulador de colônia de granulócitos)
GDP	guanosina difosfato
GLUT	transportador de glicose
GM-CSF	*granulocyte-macrophage colony-stimulating fact*or (fator estimulador de colônia de granulócito e macrófagos)
GPCR	*G-protein coupled receptors* (receptor acoplado a proteína G)
GTP	guanosina trifosfato
HETE	*hydroxyeicosatetraenoic acid* (ácidos hidroxieicosatetraenoico)
HIF	*hypoxiainducible factors* (fator de transcrição induzido por hipóxia)
HK	*hexokinase* (hexoquinase)
IDH1	isocitrato desidrogenase 1
IFN	interferon
IL	interleucina
iNOS	*inducible nitric oxide synthase* (óxido nítrico sintase induzida)
IRG1	*Immunoresponsive* gene *1* (gene imune responsivo 1)
LAL	*lysosomal acid* lipase (lipase lisossomal)
LDH	lactato desidrogenase
LDL	*low density lipoprotein* (lipoproteína de baixa densidade)
LOX	lipoxigenases
LPS	lipopolissacarídeo bacteriano

LTA	leucotrieno A
LX	lipoxina
MCT4	*monocarboxylate transporter* (transportador monocarboxilado)
MDH	malato desidrogenase
MHC	m*ajor histocompatibility complex* (complexo principal de histocompatibilidade)
MLCK	*Myosin light-chain kinase* (miosina quinase de cadeia leve)
MMP	*matrix metalloproteinase* (metaloproteinase de matriz)
MO	macrófago
mTOR	*mechanistic target of rapamycin* (alvo mecanístico da rapamicina)
NADP	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NED	etilenodiamina
NF-κB	*nuclear factor kappa B* (fator nuclear-κappa B)
NHS	N-hidroxisuccinimida
NO	óxido nítrico
PAMPs	*pathogen-associated molecular pattern* (padrões moleculares associados a patógenos)
PBS	*phosphate-buffered saline* (tampão fosfato de sódio)
PE	ficoeritrina
PFK	fosfofrutoquinase
PGC	*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator* (coativador de PPARgama)
PGDH	15-hidroxiprostaglandina desidrogenase
PHD	*prolyl hydroxylase domain* (domínio prolilhidroxilase)
PI3K	*phosphoinositide 3-kinase* (fosfatidil inositol-3 quinase)
PK	piruvato quinase
PMA	*phorbol myristate acetate* (forbol miristato acetato)
PMN	*polymorphonuclear cells* (células polimorfonucleares)
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
PPAR	*peroxisome proliferator-activated receptors* (receptor ativado por proliferadores de peroxissomos)
PPP	*pentose-phosphate pathway* (via das pentoses fosfato)
R5P	ribose-5-fosfato

REDD	*regulated in development and DNA damage response* (proteína regulada no desenvolvimento e na resposta ao dano no DNA)
ROS	*reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)
RPE	ribulose 5-fosfato epimerase
RPI	ribose 5-fosfato isomerase
RRP	receptores de reconhecimento de padrões
S7P	sedoheptulose-7-fosfato
SDH	succinato desidrogenase
SFB	soro fetal bovino
SHI	sedoheptulose 7-fosfato isomerase
SHPK	sedoheptulasequinase
SREBP	*sterol regulatory element-binding proteins* (proteínas de ligação a elemento regulador de esterol)
STAT	*signal transducer and activator of transcription* (fator de tradução de sinal e ativador de transcrição)
TAL	transaldolase
TAM	*tumor-associated macrophages* (macrófagos associados ao tumor)
TCA	*tricarboxylic acid cycle* (ciclo do ácido tricarboxílico)
TGF-β	*transforming growth factor beta* (fator de crescimento transformante beta)
TKT	transquetolase
TLR	*toll-like receptors* (receptores do tipo Toll)
TNF	*tumor necrosis factor* (fator de necrose tumoral)
TSC	complexo de esclerose tuberosa
T-TBS	tampão Tris-Tween
UDP	uridina difosfato
VEGF	*vascular endothelial growth* factor (fator de crescimento do endotélio vascular)
VLDL	*very low-density lipoprotein* (lipoproteína de muito baixa densidade)
XU5P	xilulose-5-fosfato

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 16
1 **OBJETIVO** 47
1.1 **Objetivos específicos** 47
2 **MATERIAIS E MÉTODOS** 48
2.1 **Cultura de MV3** 48
2.2 **Obtenção do meio condicionado de MV3** 48
2.3 **Obtenção de macrófagos** 49
2.4 **Polarização M(LPS+IFN), M(IL-4) e TAM** 49
2.5 **Inibição de vias metabólicas** 50
2.6 **Tratamento com o ATL** 50
2.7 **Citometria de fluxo** 50
2.8 **Expressão de mRNA (RT-qPCR)** 52
2.9 **Ensaio de *crosslinking*** 52
2.10 **Obtenção dos extratos celulares** 53
2.11 **Eletroforese e Western Blotting** 53
2.12 **Imunocitoquímica** 54
2.13 **Normalização por cristal violeta** 54
2.14 **Análise do Fluxo Extracelular Metabólico** 55
2.15 **Consumo de glicose** 56
2.16 **Produção de Lactato** 56
2.17 **Ensaio de produção de espécies reativas de oxigênio** 57
2.18 **Ensaio de produção de óxido nítrico** 57
2.19 **Ensaio de absorção de BODIPY-C16** 58
2.20 **Ensaio de hipóxia** 58
2.21 **Ensaio de citotoxidade** 59
2.22 **Análises estatísticas** 59
3 **RESULTADOS** 60
3.1 **TAMs apresentam alta expressão de marcadores M2 e baixa expressão de marcadores M1** 60
3.2 **TAMs apresentam alta atividade glicolítica** 62
3.3 **TAMs apresentam alta ativação da via Akt/mTOR** 65
3.4 **TAMs apresentam alta fosforilação oxidativa** 67

3.5 **TAMs apresentam baixa captação de ácidos graxos** 70
3.6 **A inibição da via glicolítica altera o fenótipo M2 dos TAM 72**
3.7 **A inibição da fosforilação oxidativa não altera o fenótipo dos TAM** 75
3.8 **A inibição da via das pentoses fosfato não altera o fenótipo dos TAMs** 78
3.9 **O tratamento com ATL não altera o metabolismo glicolítico dos TAMs** 81
3.10 **O tratamento com ATL induz a forma monomérica da PKM2 e sua translocação para o núcleo**..... 83
3.11 **O tratamento com ATL não altera o metabolismo oxidativo dos TAM** 87
3.12 **O tratamento com ATL induz um aumento na captação de ácidos graxos** 89
3.13 **A inibição da via glicolítica não interfere no efeito do ATL sobre os TAMs** 91
3.14 **O efeito do ATL sobre os TAMs é dependente da ativação da via das pentoses fosfato** 93
3.15 **A ativação da via das pentoses induzida pelo ATL em TAMs é capaz de restaurar suas propriedades citotóxicas e levar a morte de células tumorais**..... 96
3.16 **A restauração da citotoxidade induzida pelo ATL nos TAMs é independente da quebra do citrato citosólico**..... 98
4 **DISCUSSÃO**..... 100
CONCLUSÃO 111
REFERÊNCIAS..... 112
ANEXO A – Principais produções e prêmios durante o período do doutorado..... 123
ANEXO B – Apresentações de trabalho em simpósios, workshops e congressos..... 124

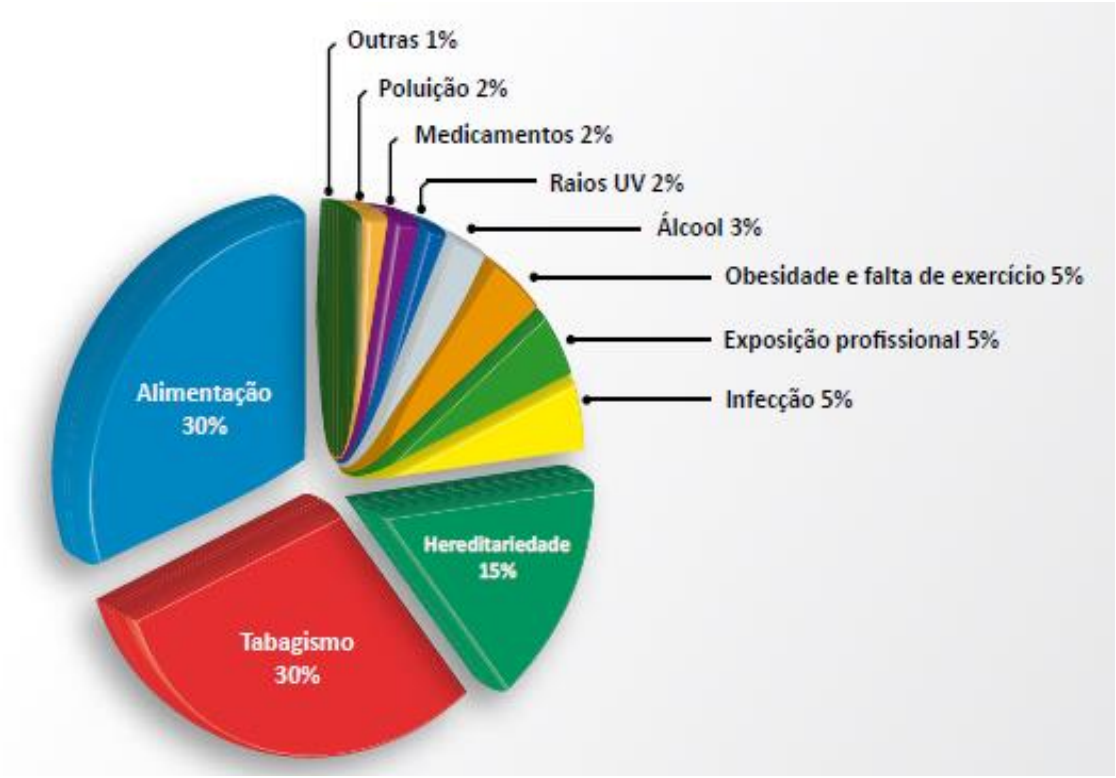
INTRODUÇÃO

Câncer

Câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento anormal de células além de seus limites habituais. Estas células podem invadir partes adjacentes do corpo e/ou se espalhar para outros órgãos. Outros termos comuns utilizados são: tumores malignos e neoplasias. O câncer pode afetar quase qualquer parte do corpo e tem muitos subtipos anatômicos e moleculares que exigem estratégias de tratamento específicas (WHO, 2019). Atualmente, o câncer é um dos problemas de saúde pública mais complexos que o sistema de saúde mundial enfrenta, dado o seu impacto epidemiológico, social e econômico. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e foi responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018. A nível global, uma em cada seis mortes são relacionadas à doença (OMS, 2018).

O câncer pode ser iniciado por diversos fatores que podem ser externos ou internos ao organismo, estando ambos inter-relacionados. As causas externas, responsáveis por 80% dos casos, estão relacionadas ao meio ambiente e aos hábitos e costumes, tais como o tabagismo, alcoolismo, hábitos alimentares e exposição à radiação solar ou radioatividade. Já as causas internas, representando 20% dos casos, são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, como por exemplo mutações herdadas e condições imunes ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (Figura 1). Esses fatores podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais (Jemal e col., 2007).

Figura 1 - Principais causas do Câncer



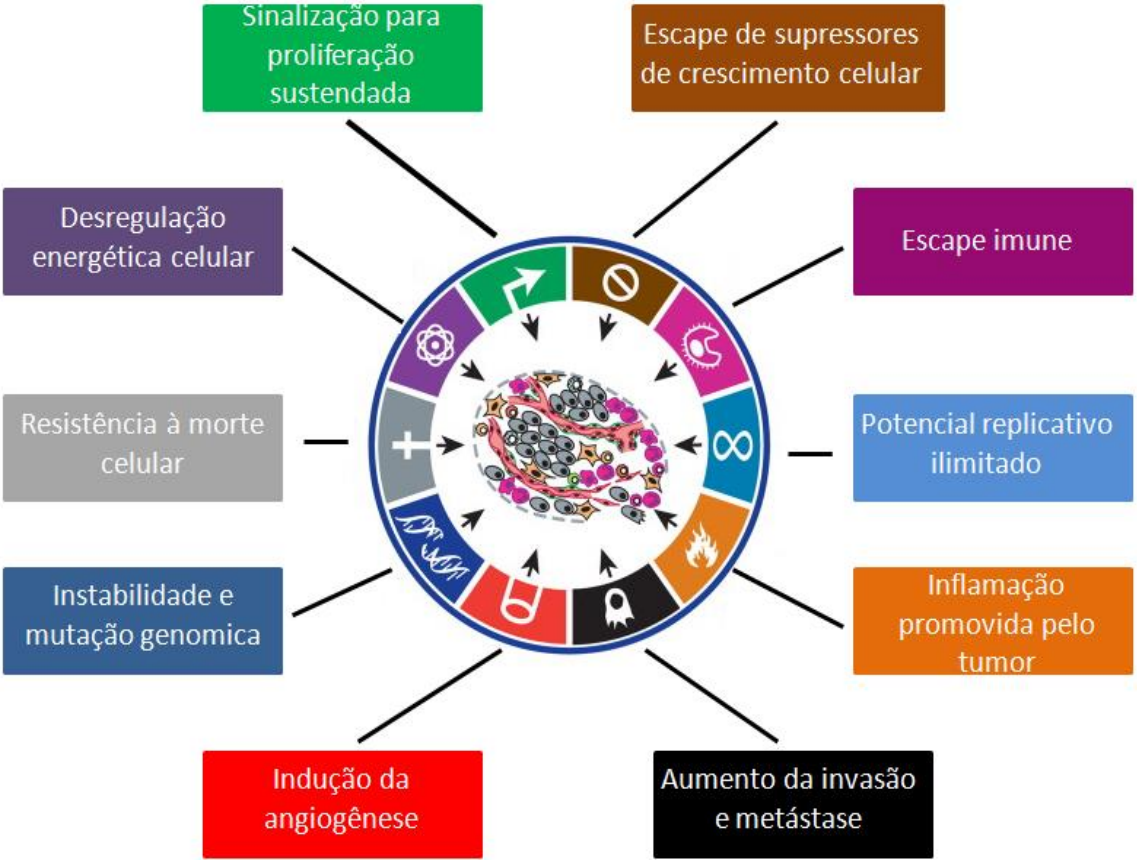
Legenda: Estatísticas sobre as principais causas do câncer.
Fonte: ABC of Cancer: Basic Approaches to the Cancer Control, 2011

O processo de formação do câncer se dá lentamente, por diferentes etapas, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere e dê origem a um tumor visível. Na etapa de *iniciação*, a primeira das três etapas da carcinogênese, as células sofrem alterações no genótipo celular, ocasionadas por mutações pontuais, amplificações ou deleções nos genes. Na fase de *promoção*, as células geneticamente alteradas, sofrem efeito dos agentes carcinógenos, classificados como oncopromotores, transformando-as de forma lenta e gradual, em células malignas. Na terceira e última etapa, a *progressão*, ocorre a multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas (Civetta & Civetta, 2011).

A proliferação anormal do tecido, denominada neoplasia, foge ao controle do organismo e tende a autonomia e a perpetuação, com efeitos bastante agressivos ao homem. As neoplasias podem ser do tipo *benigna*, a qual tem seu crescimento de forma organizada, geralmente lento e expansivo, apresentando limites bem nítidos e, apesar de não invadirem os tecidos vizinhos, podem comprimir os órgãos e tecidos adjacentes; ou *malignas*, as quais manifestam um maior grau de autonomia e são capazes de invadir tecidos vizinhos e provocar metástases,

podendo ser resistentes ao tratamento e causar a morte do hospedeiro (INCA, 2018). O desenvolvimento tumoral depende de alterações essenciais na fisiologia da célula neoplásica, como a evasão da apoptose, auto-suficiência de sinais de crescimento e insensibilidade a sinais anti-crescimento, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase, além de apresentarem potencial replicativo ilimitado, alterações no metabolismo celular, escape das células tumorais do sistema imune, instabilidade genômica e mutação e a inflamação (Figura 2) (Hanahan & Weinberg, 2011).

Figura 2 - Alterações fundamentais que levam à malignidade



Legenda: Essa ilustração engloba as seis características do câncer, propostas originalmente por Hanahan e Weinberg (2000), no qual os pesquisadores sugeriram que a maioria dos cânceres adquirem habilidades como resistência à morte celular, sinalização para proliferação sustentada, escape de supressores tumorais , aumento de invasão e metástase, potencial replicativo ilimitado e angiogênese sustentada, durante o seu desenvolvimento através da indução de vários mecanismos. Em 2011, Hanahan e Weinberg acrescentaram a capacidade de desbalanço energético, escape do sistema imune e inflamação sustentada, promovendo a proliferação tumoral. Em adição, a instabilidade genômica e mutação, que promovem alterações genéticas nas células tumorais que desencadeiam a progressão tumoral.

Fonte: Adaptada de Hanahan & Weinberg, 2011

O câncer de pele é o mais frequente no Brasil e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no país. O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos (células produtoras de melanina) e tem predominância em adultos brancos. Este tipo de câncer é considerado o mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase e mortalidade, representando 4% das neoplasias malignas do órgão (INCA, 2018). A incidência e a mortalidade por este tipo de câncer vêm aumentando no mundo. Assim, visto que apenas 12% dos pacientes com melanoma metastático sobrevivem mais de cinco anos, a chance de cura dessa doença está diretamente relacionada ao diagnóstico e ao tratamento no início do seu desenvolvimento (Gon e col., 2001). No Brasil, as estimativas do INCA do ano de 2018 apontam a ocorrência de aproximadamente 834.880 novos casos de câncer, dentre os quais, 6.260 novos casos de melanoma (3.340 em homens e 2.920 em mulheres) (Tabela 1). Tal fato vem atraindo a atenção das autoridades de saúde pública para o desenvolvimento de muitas campanhas de prevenção e diagnóstico precoce do câncer (INCA, 2018).

Os fatores de risco para todos os tipos de câncer da pele incluem sensibilidade da pele ao sol, doenças imunossupressoras, e histórico pessoal ou familiar da doença. A exposição excessiva ao sol, por sua vez, também é o principal fator de risco para o surgimento dos cânceres de pele não melanoma (INCA, 2018).

O melanoma é classificado histologicamente de acordo com a sua localização e progressão. A evolução do melanoma divide-se em quatro estágios: nevo comum ou benigno, que é formado pela alta proliferação de melanócitos normais; nevo displásico, formado pela alta proliferação de melanócitos transformados; fase de crescimento radial do melanoma; e fase de crescimento vertical do melanoma. Nesta última fase as células apresentam alto potencial metastático (Bandarchi e col., 2010).

Tabela 1 - Estimativa do número de casos novos de câncer no Brasil

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos											
	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Próstata	68.220	66,12	67,82	15.720	70,76	66,31	-	-	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	-	-	59.700	56,33	51,29	19.920	80,33	63,98
Colo do Útero	-	-	-	-	-	-	16.370	15,43	17,11	4.620	18,66	17,58
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	18,16	16,97	4.520	20,33	21,05	12.530	11,81	9,22	3.710	15,06	11,44
Cólon e Reto	17.380	16,83	20,03	5.630	25,34	25,16	18.980	17,90	18,40	6.820	27,49	20,84
Estômago	13.540	13,11	14,98	3.240	14,55	10,95	7.750	7,32	5,96	2.210	8,92	5,34
Cavidade Oral	11.200	10,86	11,22	2.770	12,38	12,03	3.500	3,28	2,86	1.010	3,89	2,80
Laringe	6.390	6,17	6,31	1.540	6,86	8,44	1.280	1,20	0,96	420	1,30	0,92
Bexiga	6.690	6,43	7,79	1.920	8,59	9,20	2.790	2,63	2,21	890	3,42	2,61
Esôfago	8.240	7,99	6,73	1.450	6,46	7,04	2.550	2,38	1,67	540	1,85	1,38
Ovário	-	-	-	-	-	-	6.150	5,79	4,80	2.140	8,46	6,54
Linfoma de Hodgkin	1.480	1,43	1,14	550	2,19	1,93	1.050	0,96	0,92	400	1,33	1,19
Linfoma não Hodgkin	5.370	5,19	5,42	1.480	6,59	6,81	4.810	4,55	4,19	1.520	6,10	5,44
Glândula Tireoide	1.570	1,49	1,50	500	1,87	1,76	8.040	7,57	5,88	2.490	10,01	7,02
Sistema Nervoso Central	5.810	5,62	5,49	1.340	6,10	6,55	5.510	5,17	5,17	1.400	5,63	4,70
Leucemias	5.940	5,75	5,51	1.480	6,69	6,58	4.860	4,56	4,29	1.190	4,72	4,59
Corpo do Útero	-	-	-	-	-	-	6.600	6,22	5,44	2.370	9,46	7,46
Pele Melanoma	2.920	2,82	2,69	800	3,34	3,31	3.340	3,16	2,15	880	3,42	2,74
Outras Localizações	41.480	40,17	35,26	9.470	42,62	43,45	36.230	34,17	29,04	8.920	36,00	28,39
Todas as Neoplasias, exceto Pele não Melanoma	214.970	208,32	217,27	52.410	235,91	226,91	202.040	190,61	191,78	61.450	247,95	199,05
Pele não Melanoma	85.170	82,53	-	17.020	76,60	-	80.410	75,84	-	17.230	69,60	-
Todas as Neoplasias Malignas	300.140	290,86	-	69.430	312,52	-	282.450	266,47	-	78.680	317,47	-
Todas as Neoplasias Malignas Corrigidas para Sub-Registro	**324.580**	**314,55**	-	-	-	-	**310.300**	**292,74**	-	-	-	-

Fonte: INCA, 2018.

Quando o melanoma é detectado em estágio inicial, o prognóstico pode ser considerado bom e geralmente é curável. Nesses casos, o principal tratamento é a cirurgia para a retirada do câncer. Outros tipos de tratamentos como a radioterapia e a quimioterapia também são utilizados, porém são ineficientes em pacientes que já apresentam metástase. O desafio, portanto, tem sido regular as células tumorais que conseguem chegar à corrente sanguínea. Por esse motivo, há uma crescente necessidade de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do melanoma (Emmett e col., 2011).

Metabolismo das células tumorais

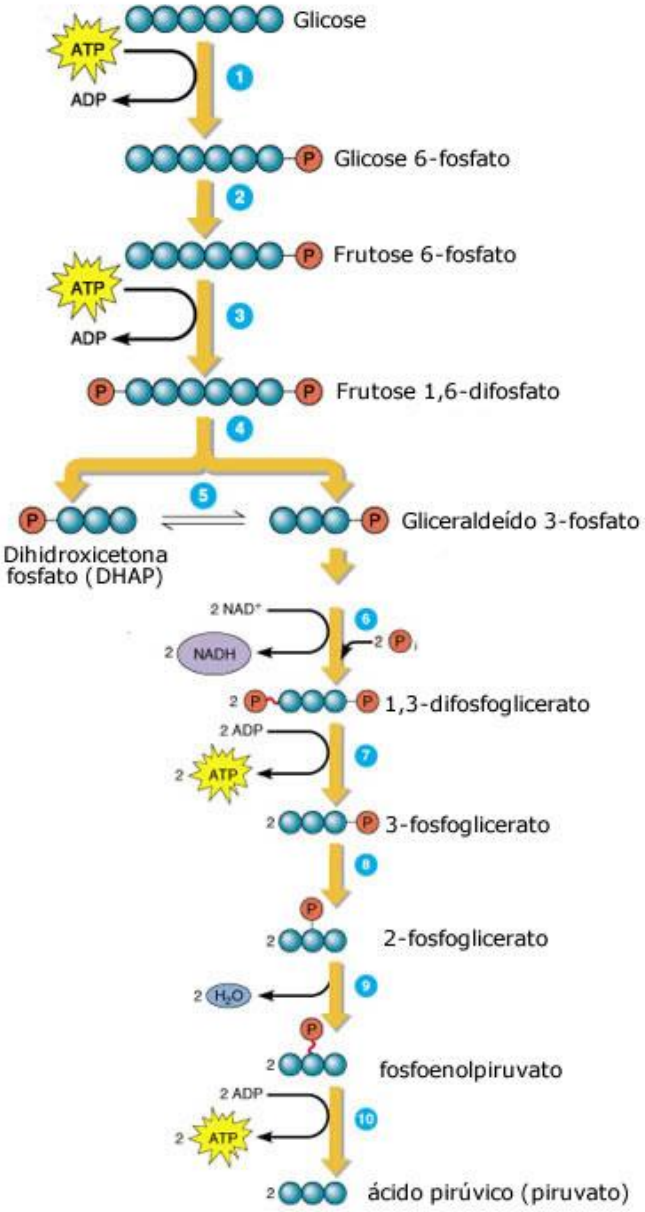
O interesse no metabolismo tumoral tem crescido cada vez mais, uma vez que alterações no metabolismo celular podem contribuir para a transformação e progressão do tumor. A compreensão do metabolismo tumoral é de extrema importância para a compreensão da fisiopatologia básica do câncer e para a oncologia clínica (Soga, 2013).

Na década de 1920, Otto Warburg descobriu que as células tumorais produzem energia em forma de ATP através da via glicolítica (figura 3), mesmo na presença de quantidades adequadas de oxigênio (Warburg, 1956; Soga, 2013). Mesmo sem limitação de oxigênio, as células podem redirecionar o piruvato gerado pela glicólise para produção de lactato, em um processo chamado glicólise aeróbica ou efeito *Warburg*. Esta geração de lactato durante a glicólise aeróbia permite que a glicólise continue por ciclização de NADH de volta para NAD^+ (Vander Heiden e col., 2009). Posteriormente, os princípios que regem a regulação glicolítica em células tumorais foram extensivamente revistos (Cairns & Mak, 2016). Warburg interpretou a secreção de lactato tumoral como uma indicação de que a respiração celular estava danificada. No entanto, diversos estudos, incluindo até mesmo o trabalho original de Warburg, não foram capazes de demonstrar que a respiração mitocondrial defeituosa como uma característica geral das células malignas (Koppenol e col., 2011). Nesse sentido, já foi evidenciado que a respiração e outras atividades mitocondriais são necessárias para o crescimento de diversos tipos de tumor (Deberardinis & Chandel, 2016).

Apesar dos estudos de Warburg, está claro hoje que grande parte das células tumorais tem a capacidade de produzir energia através da oxidação da glicose em um processo pelo qual os carbonos derivados da glicose entram no TCA (ciclo do ácido tricarboxílico ou ciclo de *Krebs*) e são oxidados a CO_2, produzindo ATP através da fosforilação oxidativa (figura 4), em ambientes normóxicos. Além disso, a limitação da produção de ATP através da via glicolítica, pela inibição da atividade da piruvato quinase, não previne a tumorigênese, sugerindo então, que a célula tumoral obtém ATP por outras vias e a glicólise possui outros papeis na progressão tumoral (Israelsen e col., 2013). Desta forma, apesar das altas taxas glicolíticas, grande parte das células tumorais geram a maior parte do ATP através da função

mitocondrial, com a provável exceção de tumores portadores de mutações em enzimas envolvidas na respiração mitocondrial (Deberardinis & Chandel, 2016).

Figura 3 – Via Glicolítica



Legenda: A glicose é fosforilada sob a ação da enzima hexoquinase em glicose-6-fosfato (G6P), essa reação é irreversível. A G6P é transformada, em seguida, no seu isômero frutose-6-fostato (F6P), por ação da enzima fosfoglicose isomerase. F6P recebe mais um grupamento fosfato e é transformada no composto frutose-1,6-bisfosfato. Esta reação também é irreversível e é catalisada pela fosfofruto-quinase, uma enzima alostérica. A frutose-1,6-bisfosfato sofre a ação da aldolase gerando uma molécula de diidroxiacetona fosfato e uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato (GAP). Sob a ação da triose fosfato isomerase, diidroxiacetona fosfato é convertida em gliceraldeído-3-fosfato. 1,3-bisfosfoglicerato é gerado pela ação da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase sobre o GAP. Essa enzima tem como coenzima o NAD (Nicotinamida adenina di-nucleotídeo). O composto 1,3-bisfosfoglicerato é um anidrido misto de um ácido carboxílico e ácido fosfórico, com um alto potencial energético permitindo que, na reação seguinte, catalisada pela fosfoglicerato

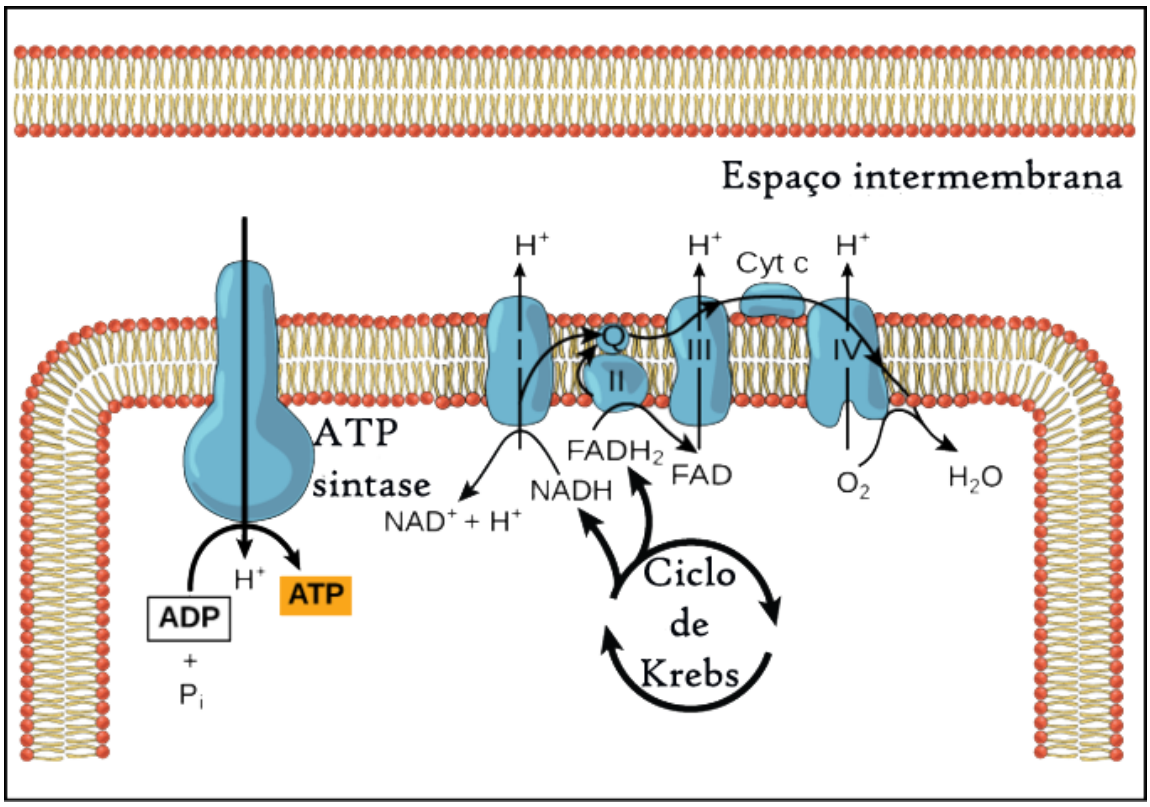
quinase haja produção de ATP. A outra reação onde ocorre síntese de ATP é catalisada pela piruvato quinase, enzima que transforma fosfoenolpiruvato em piruvato. Esta é a terceira reação irreversível da via glicolítica.

Fonte: Adaptado de 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings

Além do piruvato derivado da glicólise, os ácidos graxos e aminoácidos podem também fornecer substratos ao ciclo TCA para sustentar a produção de ATP mitocondrial em células tumorais. A degradação de ácidos graxos através da β-oxidação nas mitocôndrias gera acetil-CoA, e posteriormente NADH e $FADH_2$, que são utilizados para produzir ATP através da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria (figura 4) (Deberardinis & Chandel, 2016). O aminoácido glutamina pode gerar glutamato e, subsequentemente α-cetoglutarato para alimentar o TCA através de uma série de reações bioquímicas denominadas glutaminólise (Hensley e col., 2013; Deberardinis & Chandel, 2016). Além disso, os aminoácidos de cadeia ramificada isoleucina, valina e leucina são convertidos em acetil-CoA e outras moléculas orgânicas que também entram no TCA (Mayers e col., 2014). A flexibilidade metabólica proporcionada por diferentes *inputs* no TCA permite que as células tumorais respondam adequadamente aos diferentes combustíveis disponíveis no microambiente durante a evolução do tumor (Boroughs & Deberardinis, 2015; Deberardinis & Chandel, 2016).

Apesar da incrível heterogeneidade genética e histológica dos tumores, a malignidade parece envolver a indução comum de um conjunto de vias para suportar funções centrais, como o anabolismo, catabolismo e equilíbrio redox (Cantor & Sabatini, 2012). A indução destas vias reflete sua regulação por mecanismos de sinalização comumente alterados em células tumorais. Células normais, após estimulação por fatores de crescimento, ativam a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e as suas vias *downstream* Akt e mTOR, promovendo assim um programa anabólico envolvendo o aumento do fluxo glicolítico e a síntese de ácidos graxos induzida por SREBP. Importantes oncogenes e supressores tumorais já caracterizados estão ligados a via de sinalização PI3K-AKT-mTOR. Dessa forma, a ativação aberrante desta via está entre as alterações mais frequentes observadas em tumores (Deberardinis & Chandel, 2016).

Figura 4 – Cadeia de Transporte de Elétrons



Legenda: Na cadeia respiratória, quatro grandes complexos proteicos inseridos na membrana interna da mitocôndria realizam o transporte dos elétrons de NADH e de $FADH_2$ ao gás oxigênio, reduzindo-os a NAD^+ e FAD, respectivamente. Inicialmente, os elétrons são depositados no complexo I (NADH redutase) e II (succinato desidrogenase), respectivamente, e então transferidos para outros carreadores, os complexos III (citocromo redutase) e IV (citocromo oxidase), de uma maneira gradativa até chegar ao seu aceptor final, o O_2. Durante esta série de transferências, prótons H^+ são expelidos da matriz para o espaço intermembrana, gerando um gradiente eletroquímico responsável pelo potencial de membrana da mitocôndria ($\Delta\Psi$). Este potencial de membrana formado contribui para o armazenamento de energia livre disponível para a subsequente reação de síntese de ATP no complexo V, que ocorre através do acoplamento de ADP com fosfato inorgânico.

Fonte: Adaptado de "Chemiosmosis and Oxidative Phosphorylation." *Boundless Biology* Boundless, 26 May. 2016.

Os tumores sólidos contêm uma heterogeneidade significativa de perfusão, ou seja, muitas células tumorais residem em ambientes pobres em nutrientes e oxigênio (Deberardinis & Chandel, 2016). Para sua sobrevivência, as células tumorais necessitam, portanto, adaptar diversos mecanismos para sustentar a função mitocondrial. Por exemplo, a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial pode funcionar a níveis de oxigênio tão baixos como 0,5%. Além disso, as células tumorais hipóxicas (<2% O2) podem continuar a utilizar o TCA e usar a glutamina como combustível para a produção de ATP oxidativo (Fan e col., 2013). Células de

câncer pancreático em baixas condições de nutrientes utilizam proteínas retiradas do espaço extracelular para produzir glutamina e outros aminoácidos, alimentando o TCA para a sobrevivência e crescimento celular (Kamphorst, 2015). Além dessas adaptações, se o ambiente hipóxico comprometer a oxidação do piruvato em acetil-CoA, a glutamina pode fornecer acetil-CoA como precursor biossintético para sustentar o crescimento tumoral. Quando as células tumorais se tornam privadas de nutrientes, elas se adaptam ao microambiente, diminuindo sua demanda por ATP (Wise e col., 2011). Portanto, os tumores são capazes de reprogramar as vias de aquisição de nutrientes e seu metabolismo para atender às demandas bioenergéticas, biossintéticas e redox das células malignas. Essas atividades reprogramadas são agora reconhecidas como um dos *hallmarks* do câncer (figura 2).

Inflamação e Câncer

A inflamação também é considerada um dos *hallmarks* do câncer (figura 2). A relação entre inflamação e câncer tem sido reconhecida desde o século XVII, e hoje em dia temos bastante conhecimento sobre as células, citocinas e processos fisiológicos que são centrais tanto na inflamação quanto no câncer. Atualmente, pelo menos um terço de todos os tipos de câncer humanos tem sido associado à inflamação (Maciejczyk, 2013). Dependendo do contexto, as células inflamatórias podem ter papel benéfico ou prejudicial, estando envolvidas na patogênese de diversas doenças, incluindo as neoplasias (Coussens & Werb, 2002). A inflamação crônica pode induzir certos tipos de câncer (Bhatelia, e col., 2014; Deng, e col., 2016), e os tumores sólidos, por sua vez, podem iniciar e perpetuar processos inflamatórios locais que promovem o crescimento e a disseminação tumoral (Caronni, e col., 2015).

Estima-se que até 20% dos cânceres sejam provocados por inflamação crônica ou infecções persistentes. Muitos mediadores liberados durante a inflamação crônica promovem a proliferação celular e invasão, induzem a mutagênese e aumentam a angiogênese (Hanahan & Weinberg, 2000).

Células inflamatórias são consideradas fatores chaves na promoção da progressão tumoral devido a sua capacidade de liberar uma grande variedade de quimiocinas, citocinas, mediadores citotóxicos, como ROS, metaloproteases (MMPs), além de mediadores da morte celular, como o fatos de necrose tumoral (TNF)-α. Além disso, o microambiente inflamatório tem níveis elevados de NF-κB, prostaglandinas e microRNAs que afetam a proliferação, morte e senescência celular, além de taxas de mutação de DNA, metilação do DNA e angiogênese (Schetter e col., 2010). Citocinas, como a interleucina (IL)-6, estão presentes em diversos tipos de câncer e foram implicados na tumorigênese e metástase através da regulação do NF-κB (fator nuclear *kappa* B) e STAT3 (Dmitrieva e col., 2016). Em outro estudo, foi demonstrado que em modelos murinos, o TNF-α foi capaz de aumentar o câncer mamário espontâneo (Sangaletti e col., 2010).

Desta forma, mediadores inflamatórios podem levar à transformação e a iniciação de um fenótipo maligno e, a partir de uma expressão sustentada, promover a progressão do tumor. Ao mesmo tempo, outros fatores liberados pelas células inflamatórias levam, direta ou indiretamente, a uma supressão da resposta imune, tendo um importante papel no desenvolvimento do tumor (Coussens & Werb, 2002). Acredita-se que muitas, senão todas, as células e biomoléculas produzidas na inflamação desempenhem algum papel na iniciação e manutenção do crescimento do tumor (Munn, 2017).

Entretanto, a inflamação não é necessária para a mutagênese, e muitos tipos de câncer se formam em tecidos não inflamados. Porém, mesmo nesses casos, o próprio tumor desencadeia uma inflamação (Diakos e col., 2014). A extensão e a natureza dessa inflamação variam, mas, em geral, tendem a facilitar a progressão do tumor. Os tumores podem induzir reações inflamatórias por meio de diversos mecanismos: células tumorais podem expressar citocinas que irão recrutar neutrófilos e macrófagos que liberam moléculas inflamatórias adicionais, amplificando a resposta (Bonavita e col., 2015); o tumor em crescimento pode danificar fisicamente o tecido normal, liberando padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) que ativam receptores em macrófagos residentes, os quais iniciam mecanismos de reparo inflamatório; da mesma forma, tumores em crescimento podem comprimir vasos sanguíneos e linfáticos, impedindo o suprimento de oxigênio e nutrientes. A hipóxia resultante leva à produção de citocinas e fatores de

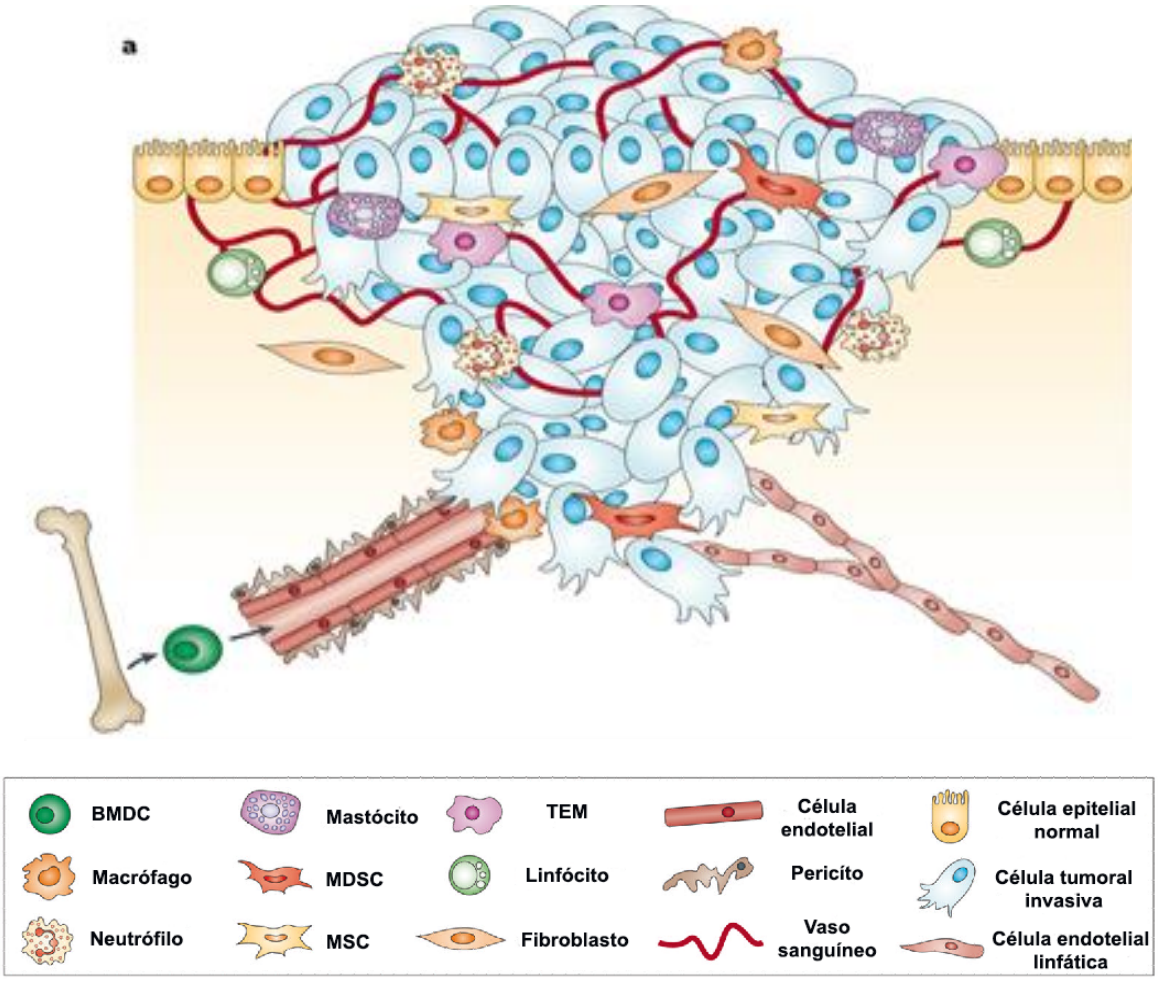
crescimento angiogenicos, que recrutam novos vasos sanguíneos e macrófagos (Stylianopoulos e col., 2012)

As características do infiltrado inflamatório tumoral interferem no desenvolvimento e progressão do mesmo. Em 1863, Virchow refletiu sobre a presença de câncer em locais com inflamação crônica prévia, sendo o primeiro a descrever a presença de leucócitos em tumores humanos. Este fato foi o primeiro indício de que o ambiente tumoral não é constituído somente por células tumorais, surgindo a ideia de que esse microambiente era capaz de contribuir para o desenvolvimento tumoral (Coussens & Werb, 2002). Após este primeiro indício observado por Virchow, anos depois, surgiram diversos trabalhos estudando a importância de células estromais para o desenvolvimento tumoral. O microambiente tumoral tornou-se um potencial alvo terapêutico, juntamente com as terapias clássicas como radioterapia, quimioterapia e cirurgia (Postovit e col., 2006).

O microambiente tumoral é extremamente complexo (figura 5), constituído por componentes da matriz extracelular tumoral, fatores de crescimento (como bFGF, VEGF, EGF, TGF-β), interleucinas, citocinas e concentrações variáveis de oxigênio. Esses fatores são capazes de regular a homeostase tecidual e o comportamento celular no tumor. Neste microambiente, existe ainda a presença de uma grande população de células heterogêneas, como fibroblastos, pericitos, células musculares lisas, células imunes e células endoteliais (Allen e col., 2011). Em grande parte, orquestrado por células inflamatórias, o microambiente do tumor é indispensável no processo neoplásico promovendo a sobrevivência, proliferação e migração das células tumorais (Coussens & Werb, 2002).

O infiltrado inflamatório de um tumor pode incluir populações de diferentes leucócitos, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, mastócitos e linfócitos, todos sendo capazes de produzir diversos tipos de mediadores (Figura 5). No microambiente tumoral, as células presentes em maior número são os macrófagos, podendo representar mais da metade das células não tumorais (Sica e col., 2002).

Figura 5 - Microambiente Tumoral



Legenda: Células tumorais em tumores primários são cercadas por um complexo microambiente, compreendendo diversos tipos celulares, incluindo células endoteliais, fibroblastos e uma variedade de células derivadas da medula óssea (BMDCs), incluindo macrófagos, células supressoras mieloides (MDSCs), monócitos expressando TIE2 (TEMs) e células-tronco mesenquimais (MSCs).

Fonte: Adaptado de Joyce e Pollard, 2009

Macrófagos: funções e alterações metabólicas

Macrófagos possuem um papel crucial na resposta primária a patógenos, na manutenção da homeostasia tecidual, na inflamação e na imunidade. Estas células desempenham diferentes funções, tais como: produção de citocinas, que orquestram o recrutamento e a ativação de outros tipos celulares; liberação de fatores de crescimento, mediadores angiogênicos e proteases, os quais promoverão o reparo tecidual; além de produzirem também espécies reativas de oxigênio e nitrogênio a fim de neutralizar e eliminar patógenos (Billings e col., 2016; Shapouri-Moghaddam e col., 2018). Durante a resposta inflamatória, macrófagos possuem a capacidade de fagocitar, processar e apresentar antígenos aos linfócitos T e remover células apoptóticas (Shapouri-Moghaddam e col., 2018).

De um modo geral e didático, os macrófagos são classificados em dois subtipos: M1, ou classicamente ativados, e M2, ou alternativamente ativados. Quando estimulados com interferon-ɣ (IFN-ɣ), LPS e agonistas de TLR, os macrófagos são direcionados a um perfil M1, com importantes funções pró-inflamatórias e antitumorais. Este perfil é caracterizado pela produção de fatores pró-inflamatórios como, por exemplo, interleucina (IL)-6, IL-12, IL-23 e fator de necrose tumoral (TNF)-α, bem como uma eficiente produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. Macrófagos M1 também podem expressar altos níveis do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e MHC de classe II. Em contraste, macrófagos M2 exercem funções anti-inflamatórias e pró-tumorais e, assim como os macrófagos M1, podem ser subdivididos em diferentes subtipos de acordo com seu estímulo específico, como IL-4 e IL-13; pela ativação de TLRs e complexos imunes; IL-10, glicocorticoides e TGF-β (do inglês: “transforming growth factor beta”); e por fatores derivados de tumor (Chanmee, 2014; Sica & Mantovani, 2012; Hao e col., 2012). Essas células exibem atividade anti-inflamatória e podem levar a potencialização da resposta Th2 e, ao mesmo tempo, antagonizar a resposta de macrófagos M1 (Sindrilaru e col., 2011).

Em 2013, durante o Congresso Internacional de Imunologia, um conceituado grupo de pesquisadores que estudam a fisiologia de macrófagos se reuniu para abordar os obstáculos da nomenclatura e descrição da ativação destas células e,

assim, estabelecer padrões experimentais para o estudo dos diferentes perfis de macrófagos. Como geralmente diversos mediadores têm sido utilizados isoladamente ou em várias combinações para a geração de populações de macrófagos polarizados, foi proposto que os pesquisadores descrevam cenários de estimulação e adotem uma nomenclatura ligada aos padrões de ativação, ou seja, M (IL-4), M (IL-10), M (IFN-γ), M (LPS) e assim por diante (Murray e col., 2014). Dessa forma, essa nomenclatura é utlizada atualmente nos estudos sobre o perfil fenotípico de macrófagos.

Macrófagos são células com alta plasticidade, podendo exercer diferentes funções de acordo com o contexto em que estão inseridos. Essa capacidade para exercer funções especializadas é controlada por sinais de polarização, como mencionado anteriormente (Sica & Mantovani, 2012). Sabe-se hoje que essa ativação diferencial dos macrófagos é criticamente apoiada por mudanças metabólicas intracelulares que estão ligadas a múltiplos aspectos da ativação destas células. A regulação dessas alterações pode controlar a ativação apropriada dos macrófagos e resultar em fenótipos diferentes (Horng e col., 2017).

A interface entre sistema imunológico e o metabolismo é um campo de estudo recente que tem despertado interesse de pesquisadores. Até então, a imunidade e o metabolismo eram tratados como processos distintos realizados de maneira independente pelo organismo. O estudo da imunidade foi focado no reconhecimento e resistência a patógenos, o que envolve seu próprio conjunto de células e atividades. Já o metabolismo era descrito como processos químicos que fornecem energia para a realização de várias funções celulares e do organismo, incluindo atividades realizadas pelas células imunes, onde concluiu-se que o metabolismo seria simplesmente a fonte de energia para o sistema imunológico (Arsenault & Kogut, 2015).

Durante o curso de uma resposta imune, as células podem atravessar vários tecidos com diversas condições de disponibilidade de nutrientes e oxigênio. Além disso, em resposta à ativação, as células imunes muitas vezes podem alterar drasticamente suas atividades funcionais. Essas alterações microambientais e funcionais representam um significativo estresse metabólico, o qual é eficientemente gerido por células do sistema imune devido a sua capacidade de reprogramar de forma dinâmica seu metabolismo (Kotas & Medzhitov, 2015; Chovatiya & Medzhitov, 2014).

Diversos sinais celulares intrínsecos e extrínsecos regulam a atividade de vias metabólicas com o objetivo de conectar as necessidades da célula, como crescimento e proliferação, com a maquinaria metabólica que irá regular a geração de produtos-chave para atender a essas necessidades celulares. Como mencionado anteriormente, células do sistema imune, como macrófagos, possuem diferentes funções, utilizando, portanto, diferentes vias metabólicas para gerar níveis de reserva de energia adequados para suportar sua sobrevivência e produzir inúmeros intermediários biossínteticos necessários ao crescimento e proliferação celular (O'Neill e col., 2016).

Desta forma, o diferente metabolismo entre os perfis de ativação dos macrófagos corresponde a um claro reflexo das funções celulares. Os macrófagos M1 desempenham um importante papel na primeira linha de defesa contra infecções bacterianas e são conhecidos por obter energia através da glicólise. Em contraste, macrófagos M2 estão envolvidos na reparação tecidual e na cicatrização, e utilizam o metabolismo oxidativo para abastecer suas funções a longo prazo. Diante disso, as diferenças metabólicas são finamente reguladas nos diferentes subtipos de macrófagos e serão descritas abaixo.

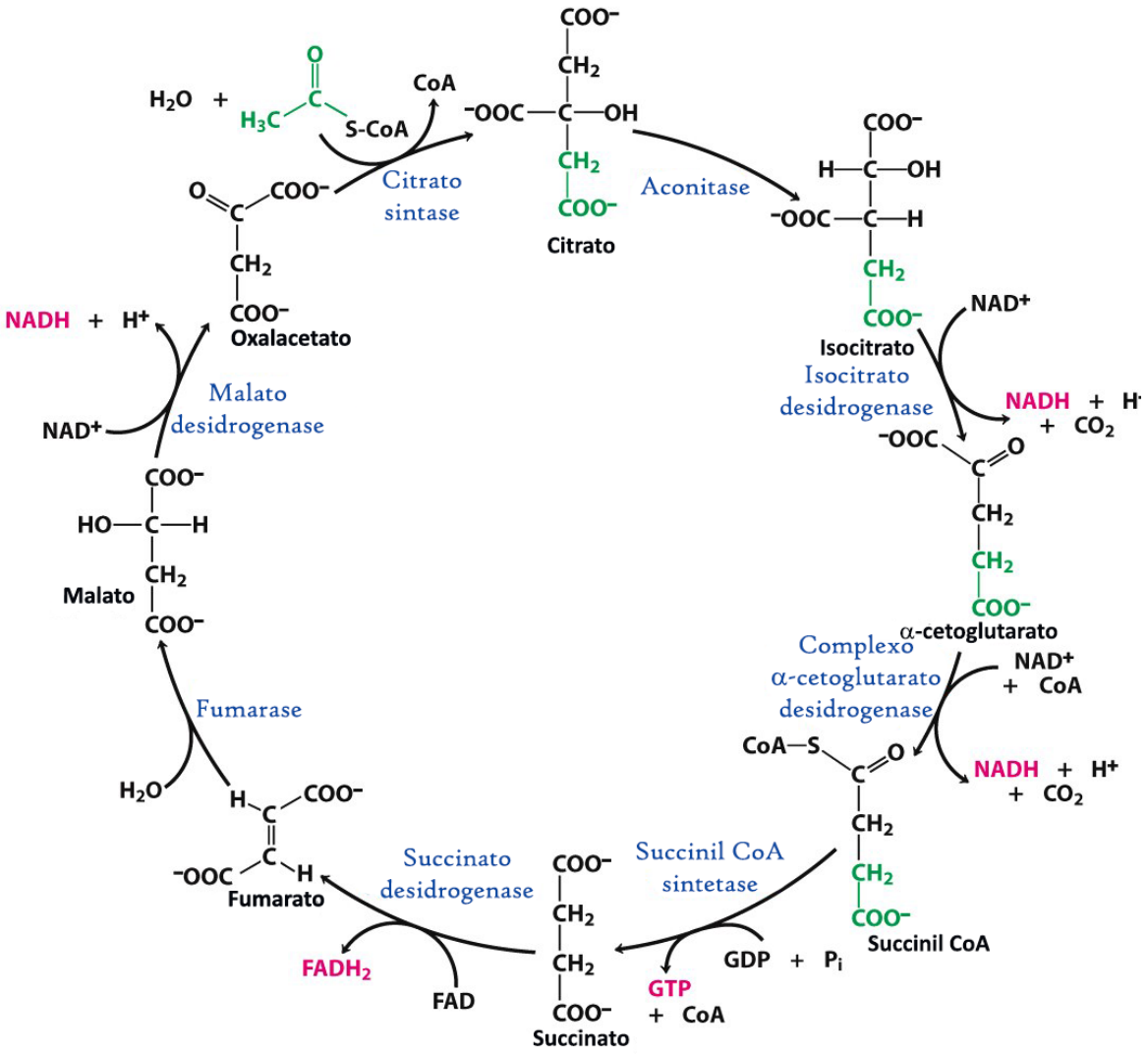
Macrófagos M(LPS) ou M(LPS + IFN-γ)

Estudos mostram que o consumo de glicose em macrófagos ativados por LPS sustenta altas taxas de glicólise aeróbica, ou seja, “metabolismo Warburg”, a produção de lactato independente da concentração de oxigênio presente. O alto metabolismo glicolítico em M(LPS) e M(LPS + IFN-γ) não apenas produz ATP para sustentar suas funções secretórias e fagocíticas, mas também alimenta a via das pentoses (PPP) (figura 7). Juntas, essas vias suportam a resposta de macrófagos inflamatórios, gerando aminoácidos para síntese de proteínas, ribose para síntese de nucleotídeos e NADPH para síntese de ROS e NO (Nagy & Haschemi, 2015; Jan Van den Bossche, 2017).

O TCA em macrófagos M(LPS) e M(LPS + IFN-γ) apresentam duas “quebras”, levando à alteração da oxidação da glicose com consequências profundas para o fenótipo de ativação (O’Neill, 2015). O TCA, normalmente, inclui uma série de

reações de oxi-redução (figura 6). Cada ciclo consome uma molécula de acetil-CoA e duas de O_2, e são formadas duas moléculas de CO_2, três de NADH, uma de $FADH_2$ e uma de GTP, como mostrado na figura 6.

Figura 6 - Ciclo do Ácido Cítrico



Legenda: Série de reações de oxi-redução do ciclo do ácido cítrico (CAC), também conhecido como o ciclo TCA (ciclo do ácido tricarboxílico) ou o ciclo de Krebs. O acetil-CoA, um composto de dois carbonos, e o oxalacetato, composto por quatro carbonos, se condensam formando um composto de seis carbonos, o citrato. Esta reação é catalisada pela citrato sintase. O citrato é então, convertido em cis-aconitato, e este é convertido pela aconitase em isocitrato. O isocitrato é então convertido em α-cetoglutarato pela isocitrato desidrogenase. Esta etapa produz NADH. A próxima etapa é realizada por um complexo de enzimas, o qual converte o α-cetoglutarato em succinil-CoA. Este é então convertido em succinato pela succinato CoA sintetase. Esta reação converte GDP em GTP. O succinato produzido é convertido em fumarato pela succinato desidrogenase, onde o FAD é convertido em $FADH_2$ nesta reação. Após isso, ocorre a hidratação da cadeia dupla de carbono do fumarato, formando malato. Esta reação é catalisada pela fumarase. A última etapa do TCA ocorre quando o malato é desidrogenado para produzir oxalacetato pela malato desidrogenase. Nesta etapa, NAD

também é convertido em NADH e o oxalacetato formado reage com acetil-CoA para formar citrato e iniciar novamente o ciclo (Berg e col., 2002; Akram, 2014).
Fonte: Adaptado de Berj, Tymoczko & Stryer, 2002

Entretanto, em macrófagos M(LPS) e M(LPS + IFN-γ), como mencionado anteriormente, este ciclo possui duas “quebras”, funcionando de maneira irregular. A primeira quebra acontece na isocitrato desidrogenase 1 (IDH1), responsável por regular o destino do citrato, que é normalmente convertido em α-cetoglutarato, levando desta forma, ao acúmulo de citrato. O citrato, quando acumulado, é utilizado como precursor para a síntese dos ácidos graxos e fosfolipídios, necessários para a expansão do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi, importante para acomodar o aumento da secreção de citocinas inflamatórias (Covarrubias e col., 2015).

Nesses macrófagos, essa regulação negativa da isocitrato desidrogenase 1 (IDH1), leva ao acúmulo de citrato. E a regulação positiva do gene imunorresponsivo 1, IRG1, uma enzima com atividade descarboxilase, leva a produção de itaconato. Este metabólito, além de ter capacidades microbicidas, é capaz de inibir competitivamente a succinato desidrogenase (SDH), levando à segunda quebra do ciclo (Festuccia e col., 2014). Como a SDH é uma subunidade do complexo II (CII) da cadeia de transporte de elétrons, a produção de itaconato perturba a atividade dessa cadeia e o metabolismo oxidativo, levando ao acúmulo do seu substrato succinato (Tannahill e col., 2013). A diminuição do TCA e da cadeia de transporte de elétrons é importante pois direciona o O_2, aceptor final de elétrons do metabolismo oxidativo, para a manutenção da produção de ROS, necessário para os efeitos pró-inflamatórios citotóxicos de macrófagos.

As vias de sinalização que modulam este mecanismo já são bem compreendidas. A sinalização induzida pelo LPS ativa a proteína quinase Akt para aumentar a captação de glicose enquanto a indução do fator de transcrição HIF-1α, um regulador importante da glicólise, permite a regulação positiva de múltiplos genes para estimular a glicólise (Everts e col., 2014; Langston e col., 2017). Em resposta à sinalização de LPS, a Akt medeia um aumento inicial no fluxo glicolítico, o qual é reforçado pela indução de HIF-1α (Byles e col., 2013). Um outro importante regulador de HIF-1α é a isoforma menos ativa enzimaticamente da piruvato quinase (PK)M2, que promove a localização nuclear e atividade transcricional de HIF-1α (Palsson-Mcdermott e col., 2015). HIF-1α também pode ser modulado pelo acúmulo

de succinato, que inibe a atividade enzimática da prolilhidroxilase (PHD), enzima responsável pela degradação de HIF-1α (Tannahill e col., 2013). Dessa forma, o HIF-1α medeia a indução transcricional de muitas enzimas glicolíticas, sendo desta forma, um regulador chave da glicólise.

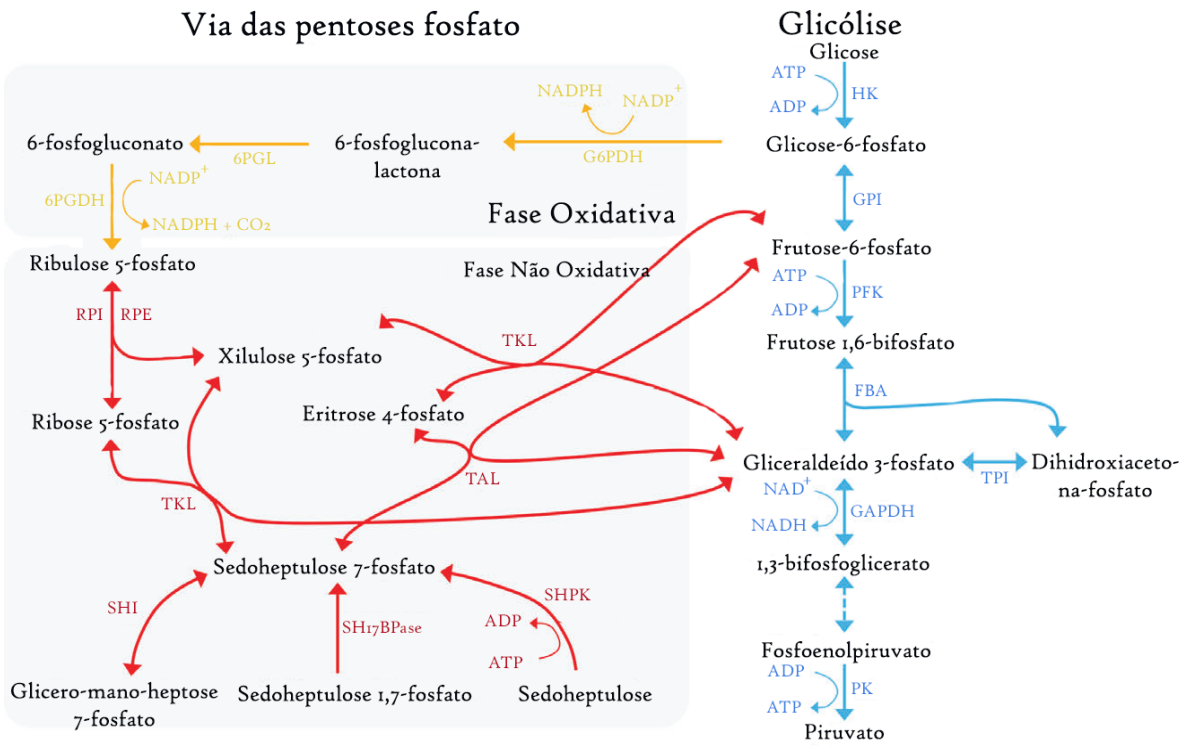
A piruvato quinase (PK) é responsável pelo último passo limitante da glicólise, representado pela conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato. Em quase todos os tipos de células (com exceção do fígado e dos glóbulos vermelhos), esta enzima existe em duas isoformas diferentes, denominadas PKM1 e PKM2, ambas codificadas pelo mesmo gene via *splicing* alternativo (Chen e col., 2012) A PKM1 está presente principalmente como um tetrâmero com alta atividade enzimática, entretanto, a isoforma PKM2 existe predominantemente como um monômero ou dímero. Embora a PKM2 monomérica ou dimérica exerça uma atividade enzimática mais baixa, como mencionado anteriormente, esta enzima possui um importante papel na condução da glicólise e da produção de lactato em células tumorais (Yang & Lu, 2013) e em macrófagos estimulados por LPS (Palsson-Mcdermott e col., 2015). Em resposta ao LPS nos macrófagos, a PKM2 nuclear dimérica (ou monomérica) forma um complexo com HIF-1α, aumentando a transcrição de IL-1β e/ou genes relacionados a via glicolítica, como da lactato desidrogenase A (*Ldha),* por ligação ao seu promotor. Além disso, foi observado que quando a PKM2 é levada ao estado tetramérico enzimaticamente ativo após tratamento com ativadores, a resposta pró-inflamatória ao LPS é atenuada. A indução da tetramerização de PKM2, além de prejudicar a glicólise e diminuir o acúmulo de succinato em macrófagos ativados por LPS, foi capaz também de induzir um aumento nos níveis de IL-10, indicando um papel desta piruvato quinase na polarização dos macrófagos (Palsson-Mcdermott e col., 2015). Adicionalmente, a tetramerização da PKM2 foi capaz de diminuir o acúmulo de ribose 5-fosfato, intermediário de PPP, induzido por LPS, sugerindo um papel para PKM2 na regulação do fluxo de carbono entre a glicólise e o PPP (Palsson-Mcdermott e col., 2015).

A sinalização disparada por LPS induz mTOR (alvo mecanístico da rapamicina), componente catalítico do complexo proteico mTORC1, uma serina-treonina quinase que controla o crescimento, diferenciação, proliferação e a sobrevivência celular (Covarrubias e col., 2015). Assim como em células tumorais, mTORC1 ativa o fator de transcrição SRBP1 em macrófagos, que, assim como o

citrato, é necessário para a síntese de ácidos graxos e lipídeos em macrófagos. O aumento da síntese lipídica mediada por mTORC1 em macrófagos estimulados por LPS é importante para a atividade fagocítica destas células, visto que é necessário um aumento das membranas celulares. Além disso, a síntese lipídica sustenta a produção de mediadores lipídicos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, como prostaglandinas e lipoxinas, respectivamente (Infantino e col., 2011). Os mediadores lipídicos são sintetizados e armazenados em corpos lipídicos, organelas citosólicas que são formadas em resposta a sinais de polarização de macrófagos de uma forma dependente de mTORC1 (Maya-Monteiro e col., 2008).

Como mencionado anteriormente, além da glicólise, a PPP também está ativada em macrófagos estimulados com LPS. A PPP suporta a síntese de NADPH (figura 7), necessária para a geração de ROS, pelo sistema NADPH oxidase, e para geração de NO pela iNOS (óxido nítrico sintase induzida). Os macrófagos M (LPS) aumentam o fluxo através da PPP através da regulação negativa de uma sedoheptulase quinase, a CARKL (Ganeshan & Chawla, 2014).

Figura 7 - Glicólise e reações oxidativas e não oxidativas da PPP



Legenda: A glicose-6-fostato da gerada na via glicolítica é utilizada pela a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), gerando 6-fosfogliconato (6PG), que será transformado em ribulose-5-fosfato a partir da descarboxilação oxidativa catalisada pela a 6-fosfogliconato desidrogenase (6PGD). A ribulose-5-fosfato é transformada em ribose-5-fosfato pela ação

de uma isomerase, e/ou em xilulose-5-fosfato pela ação de uma epimerase. A seguir, essas pentoses irão sofrer uma série de conversões catalisadas por duas enzimas, a transquetolase (TKL) e a transaldolase (TAL). A TKL é a enzima responsável pela transferência de C1 e C2 da xilulose-5-fosfato (Xu5P) para ribose-5-fosfato (R5P), formando um produto de sete carbonos (sedoheptulose-7-fosfato; S7P) e um fragmento de três carbonos (gliceraldeído-3-fosfato; G3P). Após este primeiro passo, a TAL catalisa a remoção de um fragmento de três carbonos da S7P e condensa-o com o G3P, formando frutose-6-fosfato (F6P) e tetrose eritrose-4-fosfato (E4P). Em seguida, a TKL atua novamente, formando F6P e G3P a partir de E4P e uma nova molécula de Xu5P. Duas moléculas de G3P, formadas por dois ciclos dessas reações, podem ser convertidas em uma molécula de frutose-1,6-bisfosfato (FBP) e por fim, a frutose-1,6-bifosfatase 1 e a fosfohexose isomerase podem converter FBP de volta para G6P

Fonte: Adaptado de Stincone e col., 2015

Macrófagos M(IL-4)

Macrófagos associados ao reparo tecidual, angiogênese e imunidade antiparasitária Th2, como o M(IL-4), ao contrário de M(LPS), possuem baixas taxas de glicólise, porém apresentam altas taxas de oxidação de ácidos graxos e fosforilação oxidativa. Apesar do fluxo glicolítico ser menos intenso nessas células, essa via é de fundamental importância para alimentar o TCA e suportar a respiração mitocondrial (Covarrubias e col., 2015).

Apesar do metabolismo oxidativo já estar bem relacionado a indução do perfil M2/M(IL4), o papel do metabolismo lipídico no fenótipo anti-inflamatório ainda é controverso. Estudos recentes relacionam a absorção e oxidação de ácidos graxos à indução de genes envolvidos com a polarização M(IL-4). O receptor *scavenger* CD36 foi descrito como tendo um importante papel na entrega de lipoproteínas aos lisossomos, onde são quebradas pela lipase lisossomal (LAL), liberando ácidos graxos livres que poderão ser utilizados para β-oxidação na mitocôndria.

No entanto, a síntese de ácidos graxos também está relacionada a polarização M(IL-4), visto que o bloqueio desta via leva a diminuição de genes induzidos por IL-4 em macrófagos, de forma similar à inibição da lipase lisossomal ou da β-oxidação (Huang e col., 2014). Além disso, Cader e colaboradores (2016) demonstraram que macrófagos M(IL-4) direcionam o fluxo de carbono derivado da glicólise para a lipogênese, sintetizando ácidos graxos que serão utilizados pela β-oxidação (Cader e col., 2016).

Em macrófagos, citocinas como IL-4 e IL-13 induzem o metabolismo oxidativo através da inibição de mTOR, ativando seus reguladores negativos TSC1 e TSC2. Os macrófagos que não possuem estes reguladores negativos não conseguem alterar seu metabolismo para fosforilação oxidativa (Byles, 2013).

A sinalização induzida pela IL-4 é capaz de estimular a biogênese mitocondrial aumentando assim a oxidação de ácidos graxos, uma via metabólica controlada pela proteína quinase ativada por AMP, AMPK (Mckinney e col., 2000). Além disso, o tratamento com IL-4 regula positivamente a fosforilação oxidativa, através do fator de transcrição STAT6 e do coativador-1β do PPARγ (PGC-1β). Em um estudo, foi demonstrado que a superexpressão de PGC-1β, em macrófagos derivados da medula óssea, foi capaz de reduzir produção de citocinas pró-inflamatórias. Em contraste, o *knockdown* de PGC-1β, impede a ativação de características M2, como a promoção da oxidação de ácidos graxos e a atividade da arginase (Vats e col., 2006). A AMPK é capaz também de inibir a atividade de mTOR, que está muito ativa em M(LPS), através da ativação de TSC2, bem como pela fosforilação direta da Raptor, subunidade do complexo mTOR (Robichaud e col., 2013). Além disso, a atividade da AMPK é elevada em macrófagos M(IL-4) e dirige a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (Sena e col., 2013).

Em contraste ao M(LPS), os macrófagos estimulados por IL-4 diminuem o fluxo das pentoses através da regulação positiva da sedoheptulase quinase CARKL. Esta quinase diminui o fluxo de PPP oxidativa por catalisação da formação de sedoheptulose-7-fosfato, um inibidor de PPP. Acredita-se que estes macrófagos diminuem o fluxo da via das pentoses, pois as atividades dos principais reguladores inflamatórios podem ser sensíveis ao estado redox (Haschemi e col., 2012).

Os macrófagos M(IL-4) são capazes de aumentar a utilização de glutamina, permitindo a biossíntese de UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), necessária para a glicosilação de proteínas. Esta biossíntese ocorre através da via das hexosaminas, um *shunt* glicolítico. A inibição deste processo leva a uma diminuição na expressão de marcadores M2, uma vez que receptores característicos de macrófagos M2, tais como receptores de lectina/manose, são altamente glicosilados dependendo de GlcNAc elevada (Covarrubias e col., 2015). Dados da literatura demonstram que a N-glicosilação é necessária para o endereçamento e tráfego de proteínas como CD206 e CD301 (marcadores clássicos M2) que são destinadas à exportação para a superfície celular ou para secreção. Consistente com isso, o

bloqueio da N-glicosilação ou da via da hexosamina reduz a expressão na superfície celular de marcadores M2 N-glicosilados, como por exemplo CD206 e CD301, enfatizando a importância de vias dependentes de glutamina nesses macrófagos (Jha e col., 2015). Além disso, utilização de glutamina também alimenta a atividade do TCA através da anaplerose e, assim, a fosforilação oxidativa (Covarrubias e col., 2015).

Macrófagos Associados ao Tumor (TAM)

Os macrófagos são o principal componente do infiltrado de leucócitos que está presente, em uma extensão muito variada, em todos os tumores. Os macrófagos presentes no microambiente tumoral, denominados de TAM (do inglês "tumor-associated macrophages", macrófagos associados ao tumor), possuem um papel dominante como orquestradores da inflamação relacionada ao câncer (Al-Sarireh & Eremin, 2000).

No microambiente tumoral, TAMs possuem a capacidade de afetar o tecido neoplásico em diferentes aspectos. Estudos demonstram que estes macrófagos tumorais, de acordo com seu estado de ativação, podem favorecer ou inibir a proliferação de células tumorais (Sica e col., 2002; Heller e col., 2003). Como por exemplo, podem atuar como células fagocitárias inespecíficas ou induzir a morte de células neoplásicas através da produção de mediadores (IFN-γ, IL-2 e IL-12) que estimulam o sistema imune. Além disso, estes macrófagos também inibem a atividade dos linfócitos no tumor por produzirem prostaglandinas e citocinas imunossupressoras, como a IL-10 (Sica e col., 2002). Entretanto, os TAMs podem promover o crescimento do tumor por secretar fatores de crescimento que promovem a proliferação, invasão e metástase de células tumorais, assim como induzir a angiogênese tumoral através da produção de VEGF e citocinas responsáveis (Zhu e col., 2017). Dessa forma, os macrófagos, que geralmente não apresentam propriedades antitumorais, podem ser estimulados por anticorpos ou ativadores clássicos de macrófagos, como IFN-γ e LPS e tornarem-se citotóxicos a células tumorais de maneira direta, através da produção de ROS e NO ou através da

indução de fatores que estimulam funções antitumorais em outros tipos celulares (Siveen & Kuttan, 2009).

Estudos demonstram que os TAMs possuem um perfil semelhante à polarização M2 (Chanmee, e col, 2014). A prevalência deste perfil é resultado da ausência de sinais que induzem a polarização M1, como IFN-γ ou componentes bacterianos no tumor, e a expressão de fatores que induzem este fenótipo, como fatores derivados do tumor. O CSF-1, por exemplo, além de atuar como fator quimiotático, atua como um sinal de sobrevivência e induz um fenótipo imunossupressor e pró-tumoral (Nevala, e col., *2009;* Chanmee e col; 2014*).*

Além disso, em tumores já estabilizados, como por exemplo, câncer de mama e de pâncreas, as citocinas IL-4 e IL-13 derivadas de eosinófilos e basófilos provocam uma ativação semelhante à M2 em TAMs (Kratochvill e col., 2015; De Monte e col., 2016). Adicionalmente, sinais provenientes de células tumorais (tais como quimiocinas, CSF-1 e TGFβ), células B (complexos imunitários) e células estromais (por exemplo, IL-1) podem causar alterações fenotípicas nos macrófagos, conferindo diversas funções que não se encaixam com as atribuídas à polarização clássica M1/M2 (Mantovani, 2017).

As vias de ativação e diferenciação de macrófagos variam entre os tipos de tumores, resultando assim, em fenótipos e funções heterogêneas dos TAMs (Ruffell, e col., 2012). Além disso, populações distintas de TAMs dentro de um tumor, podem exibir diferentes fenótipos. Isto se dá como resultado, por exemplo, de diferenças no acesso ao oxigênio e ativação da via do HIF-1 (Laoui e col., 2014). Desta forma, os macrófagos presentes no microambiente tumoral não possuem um fenótipo específico, podendo variar de acordo com o tipo de tumor e sua localização dentro deste tumor. O fenótipo funcional dos TAMs é modelado através de uma reprogramação metabólica. As adaptações metabólicas realizadas por essas células resultam na reprogramação funcional dos TAMs, que incluem mudanças na produção de citocinas e fatores angiogênicos, e contribuem para o crescimento do tumor, supressão de outras células imunes, progressão tumoral e metástase (Netea-Maier e col., 2018).

Metabolismo em Macrófagos Associados ao Tumor

O microambiente tumoral representa um exemplo dramático de distúrbio metabólico, onde as células circundantes do tumor podem comprometer ou suportar a alta demanda metabólica exigida pelas células tumorais, competindo por nutrientes (uma forma de concorrência intercelular) ou formando uma simbiose metabólica (uma forma de colaboração intercelular), respectivamente. Como mencionado anteriormente, a glicólise aeróbica e a glutaminólise, são rotas metabólicas dominantes em células tumorais. Desta forma, o consumo de glicose e glutamina é aumentado, sendo acumulado produtos finais ou subprodutos metabólicos, como o lactato (HSU & Sabatini, 2008; Cairns, e col., 2011). O ácido lático produzido pelas células tumorais, como subproduto da glicólise aeróbica ou anaeróbia, possui uma função crítica na sinalização de macrófagos. Este subproduto é capaz de induzir a expressão de VEGF e induzir a polarização M2 em macrófagos presentes no microambiente tumoral. Sabe-se que este efeito do ácido láctico é mediado por HIF-1α, demonstrando um mecanismo de comunicação entre o metabolismo das células tumorais e a modulação do microambiente tumoral inflamatório (Colegio e col., 2014).

Recentes estudos sugerem que TAMs são forçados a competir com as células tumorais por nutrientes, particularmente glicose e, portanto, sofrem mudanças em seu metabolismo de glicose, de uma maneira similar às células tumorais. Poucos estudos indicam que os TAMs apresentam glicólise aeróbica ativada, o que também contribui para sua reprogramação funcional (Arts e col., 2016; Liu e col., 2016). Wenes e colaboradores demonstraram que, em condições hipóxicas, os TAMs regulam positivamente a proteína REDD1 (proteína *regulada no desenvolvimento e na resposta ao dano no DNA 1*), que inibe a mTOR e, subsequentemente, inibe a glicólise e leva a um aumento da resposta angiogênica. Por outro lado, os TAMs deficientes em REDD1 são capazes de competir com células endoteliais vizinhas pela glicose, através da ativação da mTOR e aumento da glicólise, levando à normalização da estrutura vascular, e menos metástases (Wenes e col., 2016). Os dados deste trabalho sugerem que o efeito favorável de medicamentos utilizados no tratamento de tumores malignos, como inibidores de mTOR, poderia ser dificultado por seus efeitos no metabolismo dos TAMs através de

mudanças subsequentes em seu fenótipo funcional. Este estudo demonstra a importância de se estudar as adaptações metabólicas de células presentes no microambiente tumoral, como os macrófagos.

Além do metabolismo da glicose, os TAMs apresentam também alterações no metabolismo lipídico, aumentando a biossíntese, e armazenamento de ácidos graxos. Este fato tem sido associado à reprogramação funcional, embora os mecanismos permaneçam desconhecidos. Diversos estudos demonstram que os TAMs apresentam alterações no metabolismo do ácido araquidônico, apresentando uma expressão aumentada de Cox2 e um consequente aumento da produção de PGE2, importante para o desenvolvimento tumoral. Isto sugere que, após o desenvolvimento do tumor, não só as células tumorais, mas também as células imunes, como os macrófagos, são capazes de aumentar a síntese de prostaglandinas (Poczobutt e col., 2016). Além disso, a carga lipídica de macrófagos tem sido associada ao aumento da capacidade tumoricida e inflamatória. Schlager e colaboradores demonstraram que o aumento do conteúdo lipídico intracelular estava associado a um aumento na atividade citotóxica de macrófagos peritoneais murinos, particularmente naqueles que foram artificialmente enriquecidos com ácidos graxos poliinsaturados, em contraste com aqueles enriquecidos em colesterol (Schlager e col., 1983).

Assim como macrófagos M(IL-4), TAMs pró-tumorigênicos apresentam um aumento no uso da glutamina. Isto está associado a níveis elevados de UDP- GlcNA necessários para N-glicosilação de receptores associados a M2 e TAMs (Netea-Maier e col., 2018), como CD206 e CD301. Corroborando esta ideia, um estudo demonstrou que TAMs expostos a linhagens celulares de glioblastoma apresentam maior expressão de genes relacionados ao transporte e metabolismo do glutamato (Choi e col., 2015).

O metabolismo da L-arginina também tem sido ligado à função dos TAMs. Em macrófagos, a L-arginina pode ser usada para a síntese do NO ou através da via da arginase. Como mencionado anteriormente, macrófagos M(LPS) são caracterizados pela elevada via de síntese de NO, onde a arginina é convertida em NO e L-citrulina pela iNOS. O NO produzido subseqüentemente suprime a fosforilação oxidativa através da inibição de enzimas envolvidas no ciclo de *Krebs* e na cadeia de transporte de elétrons, aumentando a glicólise nestes macrófagos (Albina & Mastrofrancesco; 1993). Por outro lado, os macrófagos M2 são caracterizados pela

expressão da Arginase-1, que hidrolisa arginina a ornitina e uréia e limita a disponibilidade de arginina para a síntese de NO (Rath e col., 2014). Estudos mostram que TAMs isolados de tumores murinos mamários e ovarianos humanos apresentam baixas propriedades citotóxicas em associação com uma produção reduzida de NO e uma baixa expressão de iNOS (Klimp e col., 2001; Dinapoli e col., 1996), sugerindo que o ciclo do nitrogênio ureico pode ter um papel importante na função dos TAMs.

No entanto, pouco se sabe sobre o fenótipo metabólico específico dos TAMs e como ele modela o fenótipo funcional dessas células no microambiente tumoral. Como o programa metabólico dos TAMs pode regular suas funções protumorais, existe um interesse considerável nessa área. Diante destas evidências, entender as vias celulares e metabólicas que sustentam o fenótipo dos TAMs e suas funções, são de extrema importância em diversas etapas da progressão tumoral, tornando-os importantes alvos para a terapia contra o câncer.

Lipoxinas

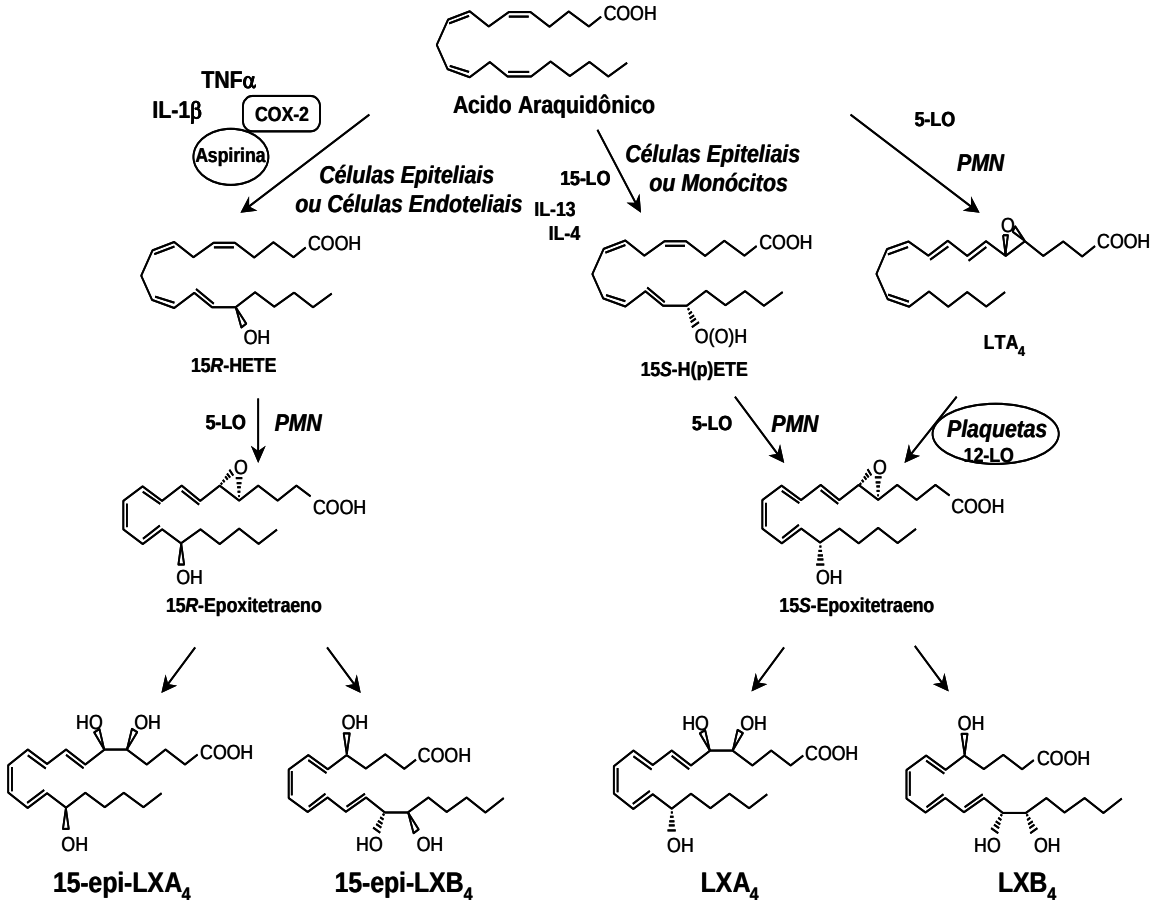
Em resposta a infecções, lesões e estímulos inflamatórios, mediadores químicos são liberados como reguladores da resposta imune. As lipoxinas (LXs) são uma dessas moléculas, com ações antiinflamatórias e pró-resolutivas. Estas são secretadas por células imunológicas, como neutrófilos e macrófagos. As lipoxinas são pequenas moléculas derivadas do ácido araquidônico (AA), e podem ser biossintetizados tanto *in vitro* como *in vivo*, em diferentes espécies, pela ação sequencial das lipoxigenases (LOX) e de outras enzimas (Godson e col., 2000).

As lipoxinas são sintetizadas a partir de interações célula-célula e possuem três diferentes vias de metabolização (Figura 8). A primeira via descrita envolve a participação das enzimas 15-LO, encontrada em células epiteliais, monócitos e macrófagos, e 5-LO, encontrada em neutrófilos (PMN). A partir da oxigenação do carbono 15 do AA pela 15-LO, é formado ácido 15S-hidroxieicosatetraenóico (15(S)-HETE), que atua como substrato para a 5-LO, induzindo a conversão de LXA_4 e LXB_4 pela ação de epoxidohidrolases (Serhan e col., 1984; Serhan & col., 1995). A segunda via de biossíntese de lipoxinas é determinada por interações que

ocorrem, predominantemente, dentro da vasculatura, entre a 5-LO e a 12-LO, presente em plaquetas (Edenius e col., 1988). Esta via envolve a síntese de LTA_4, a partir da degradação do AA pela 5-LO. O LTA_4 formado é então convertido em LXA_4 e LXB_4 pela ação da 12-LO plaquetária (Serhan & Sheppard, 1990).

A terceira via de geração de lipoxinas foi descoberta posteriormente, e envolve a participação da Aspirina®. Esta via resulta na formação de epímeros de lipoxinas, também chamados de ATL (do inglês "*aspirin triggered lipoxins*"). Esta via envolve a acetilação da COX-2 pela Aspirina®, levando a conversão do AA a 15R-HETE que é então transformado pela 5-LO, em PMN, nos 15-epímeros de lipoxinas, 15-epi-LXA_4 e 15-epi-LXB_4 (Claria & Serhan, 1995).

Figura 8 - Biossíntese das Lipoxinas e "aspirin-triggered-lipoxins" (ATL)



Legenda: Vias de biossíntese de lipoxinas e epímeros de lipoxinas a partir do ácido araquidônico.
Fonte: Adaptada de Fierro & Serhan, 2001.

As lipoxinas, assim como o ATL, são produzidas em seu próprio local de ação e, posteriormente, inativadas através de uma desidrogenação no carbono 15, originando 15-oxo-LXA_4, seguida pela redução específica da dupla ligação adjacente ao grupamento cetona (Clish e col., 2000). Além disso, as lipoxinas podem ainda sofrer ω-oxidação no carbono 20 (Clish e. col., 2000; Serhan, 2005). Devido à rápida transformação e inativação das lipoxinas, foram desenvolvidos análogos sintéticos que mantém a capacidade de ativar o seu receptor, sua integridade estrutural e ações biológicas

Efeitos biológicos

As lipoxinas (LXs) exercem a maioria de suas funções a partir da interação com seu receptor GPCR de alta afinidade, encontrado na membrana da célula, denominado ALX/FPR2 (Fiore e col., 1994). Os receptores ALX foram inicialmente identificados em cultura de células HL-60 (Fiore e col., 1994) e, poucos anos depois, foram clonados a partir de material murino (Takano e col., 1997). Em humanos, existem três FPRs funcionais: FPR1, FPR2 e FPR3. Em camundongos, o FPR1 e FPR2 são homólogos ao mFPR1 e mFPR2. A homologia estrutural entre os receptores murinos e humanos é em torno de 75-80% (Chiang e col., 2003). No entanto, este receptor é considerado “promíscuo”, visto que se liga, com menor afinidade, à outras moléculas, como peptídeos sintéticos e derivados de bactérias, além de partículas virais. Apesar de se ligar ao ALX com alta afinidade, sabe-se que a LXA_4 também é agonista de outros receptores, como o AhR (Receptor de Hidrocarboneto Arílico), porém com baixa afinidade (Chandrasekharan e Sharma-Walia., 2015).

A presença do ALX já foi descrita em diferentes tipos celulares como PMN, monócitos, células T, macrófagos, fibroblastos, células epiteliais e células mesangiais (Chiang e col., 2006). Estudos mostram que o FPR2 pode desempenhar um amplo papel na mediação das respostas inflamatórias e imunes, incluindo a defesa do hospedeiro contra a progressão de tumores. O FPR2 desempenha um importante papel na defesa antitumoral do hospedeiro através da

limitação do recrutamento de macrófagos para o tumor em resposta à quimiocina CCL2, e da posterior conversão em macrófagos M2 (Liu, e col., 2013).

Estudos *in vivo* e *in vitro* mostram que a proteína anti-inflamatória annexin A1 (ANXA1) pode ser efetiva na regulação do crescimento tumoral e metástase através de mecanismos parácrinos mediados pelo receptor FPR2/ALX (Gastardelo, e col., 2014). Foi demonstrado também, que o BML-111, um agonista do receptor da lipoxina, bloqueia a expressão de VEGF no soro e tumores murinos formados por células H22, altera características morfológicas do tumor e diminui o crescimento tumoral. Este mesmo autor mostrou que a LXA4 inibe a produção de VEGF e reduz os níveis de HIF-1α em células H22 *in vitro* (Chen e col., 2010). Alguns estudos indicam que as LXs e seus análogos possam ter, ainda, efeitos inibitórios na angiogênese induzida por VEGF (Fierro e col., 2002; Cezar-de-Mello PF e col.,2008).

As lipoxinas exibem mecanismos de ação variados em diferentes tipos celulares e em modelos animais de doenças inflamatórias, promovendo a resolução de inflamações orais, pulmonares, oculares, renais, dérmicas e gastrintestinais (Serhan & Chiang, 2008) (Figura 11).

Em neutrófilos, as LXs inibem a quimiotaxia, a aderência e transmigração (Serhan e col., 1995), além de reduzir a produção de superóxido e citocinas por essas células (Canny e col., 2002). Em eosinófilos, estes lipídeos inibem a quimiotaxia e migração, além de diminuírem a citotoxidade de células T ativadas através do bloqueio da ativação da ERK (Maddox & Serhan, 1996).

Já em células mononucleares, os efeitos desencadeados pelas LXs contrastam com aqueles promovidos em outros tipos celulares. Em monócitos as LXs apresentam efeitos estimulatórios, como a ativação da adesão e a migração de monócitos, sem causar, porém, degranulação ou liberação de espécies reativas de oxigênio (Maddox & Serhan, 1996; Maddox e col., 1997). A migração de monócitos humanos induzida pela LX é dependente da via Rho/ERK/MLCK, após ativação do ALX (Simões & Fierro, 2005). Além disso, a LX também é capaz de aumentar a sobrevida, reduzindo a apoptose de monócitos humanos via PI3K/Akt e ERK e, considerando que a LX aumenta significantemente a fagocitose de neutrófilos apoptóticos, o aumento de sua sobrevida demonstra seu papel resolutivo da inflamação (Godson e col., 2000; Simões e col., 2010). Estas atividades dos monócitos podem ser protetoras para o hospedeiro, em vista do importante papel

destas células na reparação tecidual e na resolução da resposta inflamatória. Portanto, as LX não somente inibem sinais pró-inflamatórios, mas também apresentam um papel crítico na fase de resolução do processo inflamatório.

Esses efeitos produzidos pelas lipoxinas e por seus análogos, bem como a ideia da associação do câncer com a resposta inflamatória, tornam estes lipídeos importantes alvos de estudo para o controle e progressão do câncer. Em pesquisas realizadas pelo nosso grupo, já foi visto que o ATL-1 é capaz de modificar o fenótipo de TAMs humanos *in vitro* e *in vivo*, diminuindo marcadores característicos dessas células, como CD206, arginase-1 e IL-10. Além disso, nosso grupo demonstrou que a LX restaura propriedades citotóxicas, como a produção de ROS, NO e consequentemente de peroxido nitrito, levando a apoptose das células tumorais MV3 *in vitro.* Estes efeitos da lipoxina contribuem para a diminuição do peso e do volume de tumores B16F10 induzidos em camundongos C57/BL6 e comprovam o potente efeito destes lipídeos na modulação de TAMs e controle da progressão tumoral (Simões e col., 2017).

Estes resultados obtidos pelo nosso grupo, onde a lipoxina é capaz de induzir, de forma seletiva, um *switch* do perfil M2-*like* dos TAMs em direção a um perfil M1-*like*, contrastam com outros dados da literatura, onde o tratamento com a lipoxina induz exatamente o contrário (M1 para M2), como por exemplo, em um modelo de obesidade (Borgeson e col., 2015). Apesar dos TAMs apresentarem um perfil fenotípico, com semelhança na expressão de marcadores, com macrófagos M2, estes macrófagos tumorais apresentam características metabólicas semelhantes a macrófagos M1, como já abordado nas seções anteriores. Este fato poderia explicar o efeito seletivo e diferencial da lipoxina sobre o perfil M2 dos TAMs. Diante disso, neste trabalho, elucidamos as características metabólicas dos TAMs, as comparando com macrófagos M1 e M2, e analisamos o efeito da lipoxina sobre o metabolismo destes macrófagos, bem como a importância de cada via metabólica no *switch* fenotípico e funcional induzido por este mediador.

1 OBJETIVO

Neste trabalho de tese, tivemos como principal objetivo caracterizar o perfil metabólico dos TAMs, comparando com macrófagos polarizados para M1 e para M2, e analisar o efeito da lipoxina sobre o metabolismo dessas células.

1.1. Objetivos específicos

a) Caracterizar o perfil de marcadores M2, como CD206, CD301 e CD163, e marcadores M1, como a produção de ROS e NO, em TAMs;
b) Caracterizar o perfil metabólico dos TAMs, analisando vias como a glicólise, fosforilação oxidativa, via das pentoses e metabolismo de ácidos graxos;
c) Analisar a importância da via glicolítica na manutenção de características específicas dos TAMs, como a porcentagem de marcadores M2, inibindo esta via com 2-*deoxy-D-glicose*;
d) Analisar a importância da respiração mitocondrial na manutenção de características específicas dos TAMs, como a porcentagem de marcadores M2, submetendo estas células à hipóxia;
e) Analisar a importância da via das pentoses na manutenção de características específicas dos TAMs, como a porcentagem de marcadores M2, inibindo esta via com 6-aminonicotinamida;
f) E por fim, analisar o efeito da 15-epi-LXA_4 no metabolismo dos TAMs, e a importância, de cada via analisada anteriormente, no efeito disparado por este mediador nesses macrófagos tumorais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultura de MV3

Em nossos experimentos, utilizamos a MV3, uma linhagem celular de melanoma humano com alto potencial metastático, gentilmente doada pelo Dr. Cezary Marcienkevickz, (Temple University PA, USA) (van Muijen e col., 1991). Anteriormente aos experimentos, foi realizado um controle de micoplasma através do kit *PCR based* Venor™ GeM Mycoplasma (Sigma Aldrich). As células MV3 foram mantidas em cultura na presença do meio DMEM (Gibco Invitrogen Corporation®), suplementado com 10% de SFB (Cultilab®) em pH 7,1, a 5% de CO_2 e temperatura constante de 37ºC. As células foram armazenadas em garrafas de cultura (Corning®). O meio de cultura foi renovado ou as células foram repicadas, quando confluentes, a cada 2-3 dias. Para soltá-las da garrafa, as células foram lavadas com HANK's e incubadas com HANK's EDTA (5mM) durante 5 minutos. Depois de serem descoladas do plástico da garrafa, as células foram centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos e ressuspendidas para nova cultura ou para a realização dos experimentos. O número de células presentes na suspensão celular foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão por Azul de Tripan (Gibco Invitrogen Corporation®) 0,2% em PBS.

2.2. Obtenção do meio condicionado de MV3

Células MV3 foram semeadas em placas de 24 poços (3×10^5) cultivadas com 1 mL de meio de cultura DMEM (Gibco Invitrogen Corporation®), suplementado com 10% de SFB (Cultilab®). Após 3 dias, o sobrenadante das células foi retirado, centrifugado (à 1200 rpm por 10 minutos), filtrado (filtro de 0,20 µm - GVS) e armazenado em alíquotas em freezer – 80 Cº para posterior utilização.

2.3. **Obtenção de macrófagos**

Monócitos humanos foram isolados do sangue periférico de voluntários sadios. Para isso, o sangue foi retirado e tratado com EDTA 5%. Em seguida foi adicionado 5 mL de sangue em 5 mL de Ficoll-Hypaque® e centrifugados (400 x g/ 25°C/ acc 5) por 40 minutos. A camada de células mononucleares foi coletada, lavada com solução salina e ressuspendida em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco Invitrogen Corporation®) sem SFB (incompleto). As células foram contadas em câmara de Neubauer, semeadas em placas de cultura (Corning®) e incubadas por 40 minutos a 37°C. As células não aderentes (linfócitos e plaquetas) foram removidas da placa e RPMI suplementado com 10% de SFB foi adicionado às células remanescentes. Para a diferenciação em macrófagos, os monócitos obtidos cultivados em placas de 6 (3 x 10^6 células/poço), 24 (10^6 células/poço) ou 96 (2 x 10^5 células/poço) poços, contendo 2 mL, 1mL ou 200 µL (respectivamente) de meio RPMI suplementado com 10% de SBF foram incubados por 7 dias em estufa à 5% de CO_2 e temperatura constante de 37ºC. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão por Azul de Tripan (Gibco Invitrogen Corporation®) 0,2% em PBS.

2.4. **Polarização M(LPS+IFN), M(IL-4) e TAM**

Para induzir a polarização M1/M(LPS+IFN) e M2/M(IL-4), macrófagos derivados de monócitos humanos cultivados em placas de 6, 24 ou 96 poços, nas concentrações e condições descritas anteriormente, foram estimulados com LPS (1 µg/mL) + IFN -ɣ (100 ng/mL) ou IL-4 (40 ng/mL) respectivamente por 72 horas. Para a obtenção dos TAMs, o meio condicionado de células MV3 foi adicionado por 72 horas à cultura de macrófagos na proporção 1:1 para o RPMI suplementado com 10% FBS. Nas próximas seções, chamaremos M1/M(LPS+IFN) apenas de M1 e M2/M(IL-4) apenas de M2.

2.5. Inibição de vias metabólicas

Para a inibição da via glicolítica, via das pentoses e da ATP- citrato liase (ACLY), macrófagos polarizados para M1, M2 e TAM, como descrito anteriormente, foram tratados com: *2-deoxy-D-glucose* (2DG), um análogo não metabolizável da glicose que inibe a fosforilação da glicose pela hexoquinase, o primeiro passo da glicólise, inicialmente diluído em H_2O, na concentração final de 1mM em RPMI; *6-aminonicotinamide* (6AN), um inibidor da G6PDH, importante enzima da via das pentoses, inicialmente diluído em DMSO, na concentração final de 200 µM em RPMI; e SB204990, um inibidor da ATP-citrato liase, inicialmente em DMSO, na concentração final de 5 µM em RPMI.

2.6. Tratamento com o ATL

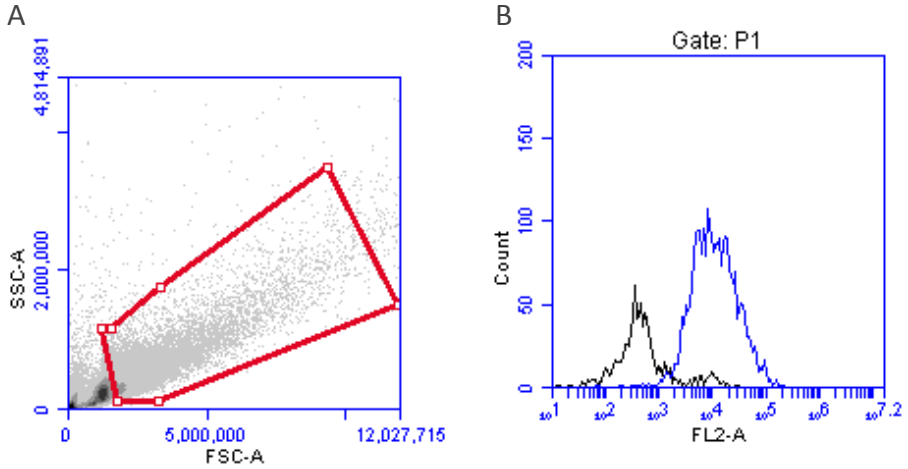
Para o tratamento das células com ATL, macrófagos polarizados para M1, M2 e TAM, como descrito anteriormente, foram lavados, para retirada de SFB presente no meio de cultura, e tratados com 15-epi-LXA_4 (ATL – Cayman Chemical), inicialmente diluído em etanol, na concentração de 10 nM em RPMI por 15 minutos. Após este tempo, foi adicionado 10% de SFB ao meio de cultura e as células foram incubadas por 72 horas em estufa à 5% de CO_2 e temperatura constante de 37ºC. Em experimentos com macrófagos tratados com ATL e inibidores, foi realizado o pré-tratamento com os inibidores por 30 min, e posteriormente foi adicionado o ATL à cultura.

2.7. Citometria de fluxo

Para análise de marcadores de superfície, macrófagos cultivados em placa de 96 poços (2 x 10^5 células/poço) polarizados para M1, M2 e TAM, tratados ou não com ATL e/ou inibidores, como descrito anteriormente, foram retirados da placa

utilizando Accutase (Sigma-Aldrich), lavados com PBS e baixados através de centrifugação à 1200 rpm por 10 minutos. Os *pellets* obtidos foram ressuspendidos e incubados em 200 µL de tampão para citometria de fluxo (2% BSA, 5% SFB, 0,1% azida sódica em PBS) por 30 minutos. Após este tempo, as células foram divididas em 2 tubos, marcadas com diferentes mixes de anticorpos conjugados à fluoróforos na concentração de 1:100 (anti-CD86-Alificocianina (APC) + anti-CD206-ficoeritrina (PE) e anti-CD301-ficoeritrina (PE) + anti-CD163-alificocianina (APC)); Biolegend) por 30 minutos. As células foram, então, lavadas com tampão, ressuspendidas em 100 µL do mesmo e imediatamente adquiridas em citômetro de fluxo (BD Accuri™ C6). Os respectivos isotipos foram utilizados para controle do experimento. Para cada amostra individual foram adquiridas informações relativas ao tamanho (FSC), granulosidade (SSC) e intensidade relativa de fluorescência de 10.000 eventos. Após a seleção da região de interesse (P1) (figura 9A), o percentual de subpopulações celulares fluorescentes foi obtido em gráficos de histograma (figura 9B). Os dados foram coletados e analisados utilizando o BD Accuri™ C6 Software.

Figura 9 - Estratégias utilizadas para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo



Legenda: Estratégias utilizadas para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo. (A) Gráfico de distribuição FSC versus SSC utilizado para a seleção da população de interesse, macrófagos – P1. (B) Histograma representativo utilizado para quantificar o percentual de subpopulações celulares específicas, dentro da população selecionada (P1). Células não marcadas em preto e células marcadas (PE-FL2 ou APC-FL4) em azul.

Fonte: A autora, 2019.

2.8. **Expressão de mRNA (RT-qPCR)**

O RNA total de macrófagos cultivados em placa de 6 poços (3 x 10^6 células/poço) polarizados para M1, M2 e TAM, tratados ou não com ATL, como descrito anteriormente, foi isolado utilizando o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen®), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A quantidade e qualidade de RNA foram analisadas por absorbância em NanoVue Plus (GE Healthcare®) e posteriormente tratadas com DNAse. As amostras de RNA (100 ng) foram retro-transcritas em DNA complementar utilizando o kit de Transcrição Reversa de Alta Capacidade de cDNA (Applied Biosystems®), de acordo com o protocolo do fabricante. O cDNA foi amplificado utilizando os primers HK-II (Qiagen - QT00013209) e GAPDH (Qiagen – QT00079247). O nível de expressão gênica analisado foi normalizado pelo GAPDH.

2.9. **Ensaio de *crosslinking***

O suberato dissucinimidílico (DSS) é um *crosslinker* permeável à membrana e não clivável que contém um éster N-hidroxisuccinimida (NHS) reativo com amina em cada extremidade de um braço espaçador de 8 carbonos. Estes ésteres NHS reagem com aminas primárias a pH 7-9 para formar ligações amida estáveis, permitindo a identificação de interações de proteína fracas ou transitórias.

Para análise da expressão monomérica ou tetramérica da PKM2, macrófagos cultivados em placa de 24 poços (10^6 células/poço) polarizados para M1, M2 e TAM, e tratados ou não com ATL, como descrito anteriormente, foram tratados com DSS (Thermo Scientific Pierce®), inicialmente diluído em DMSO, na concentração final de 500 µM em PBS por 30 minutos. Após este tempo, foi realizado o quenching da reação com Tris (50 mM) por 15 minutos. Os lisados foram obtidos como descrito abaixo, e então, analisados por *western blotting.*

2.10. **Obtenção dos extratos celulares**

Para obtenção dos extratos celulares, macrófagos cultivados em placa de 24 poços (10^6 células/poço) polarizados para M1, M2 e TAM, e tratados ou não com ATL, como descrito anteriormente, foram ressuspendidos em tampão de lise RIPA (Tris 50 mM, NaCL 150 mM, Triton X-100 1%, SDS 0,1%, EDTA 5 mM, NAF 50 mM, Na_3VO_4 1 mM, Pirofosfato de sódio 30 mM, DTT 2mM, PMSF 2 mM, Leupeptina 25 µM e aprotinina 100µg/mL). O conteúdo de proteínas do extrato total foi determinado pelo método de BCA (Thermo Scientific®). Posteriormente, foi adicionado 20% de tampão de amostra 5 vezes concentrado (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, SDS 1%, β-mercaptoetanol 5%, Glicerol 10%, azul de bromofenol 0,001%) à cada amostra, sendo estas então, fervidas por 5 minutos para sua desnaturação, e guardadas em freezer para posteriores análises por *western blotting*, como descrito abaixo.

2.11. **Eletroforese e Western Blotting**

O volume dos extratos celulares correspondentes a 20 µg de proteína foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE, onde foram separadas de acordo com o peso molecular. Após a separação, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare®). Após o bloqueio das membranas com solução de BSA 5% em T-TBS (TBS + 0,1% Tween®), as membranas foram incubadas *overnight* a 4ºC com anticorpo primário específico (1:1000). Após 3 lavagens de 5 minutos com T-TBS, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados a peroxidase (1:10.000) por 1 hora e meia. Após 3 lavagens de 5 minutos com T-TBS, as membranas foram, então, secadas e incubadas com solução de quimioluminescência (kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagent-GE Healthcare®). As bandas imunorreativas foram visualizadas no ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad®). As imagens foram analisadas com o software ImageJ (NIH/USA).

2.12. **Imunocitoquímica**

Macrófagos foram cultivadas em placa de 96 poços preta (2 x 10^5 células/poço), polarizados para M1, M2 e TAM, e tratados ou não com ATL, como descrito anteriormente. Após isso, as células foram fixadas com paraformaldeído 4%, e posteriormente lavadas com 100 µL de PBS 2 vezes. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com BSA por 1 hora e as células foram ìncubadas com anticorpos primários anti-GLUT1 (1:100 – Millipore), anti-CD36 (1:200 – Sigma-Aldrich) ou anti-PKM2 (1:200 – Sigma-Aldrich) *overnight* à 4° C. Posteriormente, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e incubadas com anticorpo secundário apropriado conjugado com Alexa488 ou Alexa555 por 1 hora. Os núcleos foram corados com DAPI (Molecular probes) ou Hoechst (Sigma-Aldrich). Para análise da PKM2, após a etapa de fixação, as células foram permeabilizadas com PBS 0,2% de Triton-X, lavadas 2 vezes com PBS e posteriormente marcadas com o anticorpo anti-PKM2. As imagens foram adquiridas utilizando um leitor de placas confocal ImageXpress Ultra (Molecular Devices) e depois processadas e quantificadas com o software MetaXpress (Molecular Devices). Os gráficos representam a intensidade integrada (para a marcação de interesse) por célula, quantificada pelo software. Resumidamente, a intensidade integrada para a marcação de interesse é calculada subtraindo a intensidade de pixels total do *background* e excluindo os debris celulares. Além disso, a intensidade integrada é normalizada pelo número total de células, contadas através da marcação do núcleo com DAPI ou Hoechst. Todos os dados foram derivados de poços em duplicata e 4 campos por poço.

2.13. **Normalização por cristal violeta**

Para normalização, após a realização dos ensaios, os macrófagos foram fixados com 100 µL de paraformaldeído 4% por 20 minutos. Após este período, o sobrenadante foi retirado e as células lavadas 3 vezes com 100 µL de PBS. Posteriormente foi adicionado 50 µL de cristal violeta (0,05 % em H_2O) em temperatura ambiente por 30 minutos. Após 5 lavagens com 100 µL de PBS por

poço, a placa foi deixada *overnight* à temperatura ambiente para secagem total do líquido remanescente nos poços. Após secagem, foi adicionado 100 µL de ácido acético (10% em H_2O) em cada poço, para solubilização do cristal violeta, e a absorbância foi determinada em leitor de placa à 590 nm (Envision-Perkin-Elmer). Cada medida obtida corresponde à densidade óptica (D.O) referente à quantidade de células presente em cada poço. Os gráficos obtidos através das metodologias descritas nas seções 3.14; 3.17; 3.18; e 3.19, foram normalizados pela quantidade de célula através da D.O do cristal violeta.

2.14. **Análise do Fluxo Extracelular Metabólico**

Macrófagos cultivados em placa de 24 poços (10^6 células/poço) polarizados para M1, M2 e TAM, tratados ou não com ATL, como descrito anteriormente, foram retirados da placa utilizando Accutase (Sigma-Aldrich), lavados com PBS, baixados através de centrifugação à 1200 rpm por 10 minutos, ressuspendidos em PBS e contados no Muse® Cell Analyzer (Millipore). Os macrófagos (2,5 x 10^5) foram então, plaqueados em placas de cultura celular XF-24 (Seahorse Bioscience) e cultivados por 24 horas em 100 µL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB em estufa à 5% de CO_2 e temperatura constante de 37ºC. Antes das avaliações, as células foram lavadas e incubadas com 500 µL de RPMI livre de vermelho de fenol (Sigma-Aldrich) durante 1 h. A taxa de consumo de oxigênio (OCR) foi avaliada no *Seahorse Flux Analyzer* XF-24 (Seahorse Bioscience) de acordo com as instruções do fabricante. As características da fosforilação oxidativa foram calculadas a partir das alterações nas taxas de consumo de oxigênio em resposta a oligomicina (inibidor da ATP sintase – 1 µM), FCCP (desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial – 0,9 µM) e rotenona + antimicina A (inibidor do complexo mitocondrial da cadeia respiratória I e III respectivamente – 1 µM). Os gráficos de barra representam a Respiração Basal, Respiração Máxima e Produção de ATP calculados respectivamente pelas equações:

(última medição de taxa antes da primeira injeção de oligomicina) – (medição da taxa mínima após injeção de rotenona + antimicina A);

(medição da taxa máxima após injeção de FCCP) – (medição da taxa mínima após injeção de rotenona + antimicina A);
(medição da última taxa antes da injeção de oligomicina) - (medição da taxa mínima após injeção de oligomicina).

2.15. **Consumo de glicose**

Para análise do consumo de glicose, o sobrenadante de macrófagos cultivados em placa de 96 poços (2 x 10^5 células/poço) polarizados para M1, M2 e TAM, tratados ou não com ATL e/ou inibidores, foi retirado e a concentração de glicose presente foi analisada utilizando o kit colorimétrico enzimático (K082-Bioclin®) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Este kit se baseia na atividade da glicose oxidase, a qual oxida a glicose gerando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio, que em presença da peroxidase reage com a 4-aminoantipirina e fenol, gerando um cromógeno vermelho cuja intensidade de cor é proporcional a concentração de glicose. A absorbância de cada amostra foi lida em 505 nm através do leitor de placa (Envision – Perkin-Elmer). O consumo de glicose foi definido através da subtração da absorbância referente à cada amostra de sobrenadante da absorbância referente ao controle (meio de cultura RPMI).

2.16. **Produção de Lactato**

Para análise da produção de lactato, o sobrenadante de macrófagos cultivados em placa de 96 poços (2 x 10^5 células/poço) polarizados para M1, M2 e TAM, tratados ou não com ATL e/ou inibidores, foi retirado e a concentração de lactato presente foi analisada utilizando o kit colorimétrico enzimático (K084-Bioclin®) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Este kit se baseia na atividade da lactato desidrogenase (LDH) que catalisa a oxidação do L-Lactato a Piruvato, com conseqüente redução do NAD^+ a NADH. A concentração de L-Lactato

é relativa à formação de NADH e detectada através da medida da absorbância a 340 nm. A absorbância de cada amostra foi lida em do leitor de placa (Envision – Perkin-Elmer).

2.17. **Ensaio de produção de espécies reativas de oxigênio**

Para análise de espécies reativas de oxigênio (ROS), macrófagos foram cultivados em placa de 96 poços branca (2 x 10^5 células/poço) polarizados para M1, M2 e TAM, como descrito anteriormente. Após a polarização, o meio de cultura foi retirado, os poços lavados com HBSS, para retirada do SFB e vermelho de fenol, e as células foram pré-tratadas ou não com 6-AN (100 µM) por 30 minutos em HBSS, seguido pela incubação na presença ou ausência de ATL (10 nM). Logo em seguida, foi adicionado Luminol, inicialmente diluído em DMSO, na concentração final de 50 µM em HBSS em cada poço. O sinal de luminescência foi quantificado integrando a emissão de luz ao longo de 60 minutos utilizando um leitor de placa controlado por temperatura (Envision-Perkin-Elmer). O PMA (10µg/mL) foi utilizado como controle positivo, porém não mostrado nos gráficos. Os gráficos foram obtidos através do cálculo da área sobre a curva (AUC) no período de 60 minutos.

2.18. **Ensaio de produção de óxido nítrico**

Para análise da produção de óxido nítrico (NO), o sobrenadante de macrófagos cultivados em placa de 96 poços (2 x 10^5 células/poço) polarizados para M1, M2 e TAM, tratados ou não com ATL e/ou inibidores, como descrito anteriormente, foi retirado e a concentração de NO presente foi estimada através da quantificação de nitrito pela reação de Griess. Nesta reação, o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido e o composto formado reage com o cloridrato de N-(l-naftil) etilenodiamina (NED), gerando um composto de coloração intensa. A concentração de nitrito foi medida por absorbância a 346 nm em leitor de placa

(Envision-Perkin-Elmer) e se refere à curva padrão de nitrito de sódio (dissolvido em solução de meio de cultura RPMI) dentro de uma faixa de concentração.

2.19. **Ensaio de absorção de BODIPY-C16**

Para análise da absorção de ácidos graxos exógenos, macrófagos foram cultivados em placa de 96 poços preta (2 x 10^5 células/poço) polarizados para M1, M2 e TAM, tratados ou não com ATL, como descrito anteriormente. Após o tratamento, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS e incubadas com BODIPY FL_{C16} (análogo do palmitato conjugado a um fluoróforo), inicialmente diluído em etanol, na concentração final de 5 mM em BSA livre de ácidos graxos durante 30 min à temperatura ambiente. As células foram então lavadas duas vezes com PBS gelado e a fluorescência referente ao BODIPY FL_{C16} absorvido pelas células foi analisada através de leitor de placas (Envision-Perkin-Elmer) com filtros setados para 493 nm (λ_{ex}) e 503 nm (λ_{em}).

2.20. **Ensaio de hipóxia**

Para as condições de hipóxia, macrófagos cultivados em placa de 24 poços (10^6 células/poço) polarizados para M1, M2 e TAM, tratados ou não com ATL, como descrito anteriormente, foram incubadas em câmara de hipóxia (*Modulator Incubator Chamber,* STEMCELL Technologies®) regulada a 5 % de CO_2, 94,5 % de N_2 e 0,5 % de O_2 por 12 horas à 37° C. Após esse tempo, o sobrenadante foi recolhido e as células analisadas por citometria de fluxo.

2.21. **Ensaio de citotoxidade**

Macrófagos foram cultivados em placa de 96 poços preta (5 x 10^4 células/poço) polarizados para M1, M2 e TAM, tratados ou não com ATL e/ou inibidores, como descrito anteriormente, foram lavadas, retirando os inibidores e o ATL do meio, e foram co-cultivadas com células MV3 marcadas com CMFDA, na concentração final de 2,5 µM em HBSS, por 24 horas (2:1; Macrófagos:MV3). Posteriormente, os poços foram lavados e a fluorescência do CMFDA, referente às células MV3 vivas, foi quantificada utilizando leitor de placas (Envision-Perkin-Elmer) com filtros setados para 485 nm (λ_{ex}) e 516 nm (λ_{em}). A sobrevivência das células tumorais MV3 co-cultivadas com os diferentes subtipos de macrófagos, foram quantificadas através da porcentagem de fluorescência relativa ao controle (células MV3 cultivadas na ausência de macrófagos – correspondente a 100% nos gráficos).

2.22. **Análises estatísticas**

Os resultados obtidos são expressos como média ± desvio padrão. Os dados foram analisados por teste t-Student (para experimentos com apenas 2 grupos) ou teste one-way ANOVA, seguido pelo teste t-Bonferroni (para experimentos com mais de 2 grupos), com auxílio do programa GraphPad Prism 7. $P \leq 0,05$ foi considerado como estatisticamente significante

3 RESULTADOS

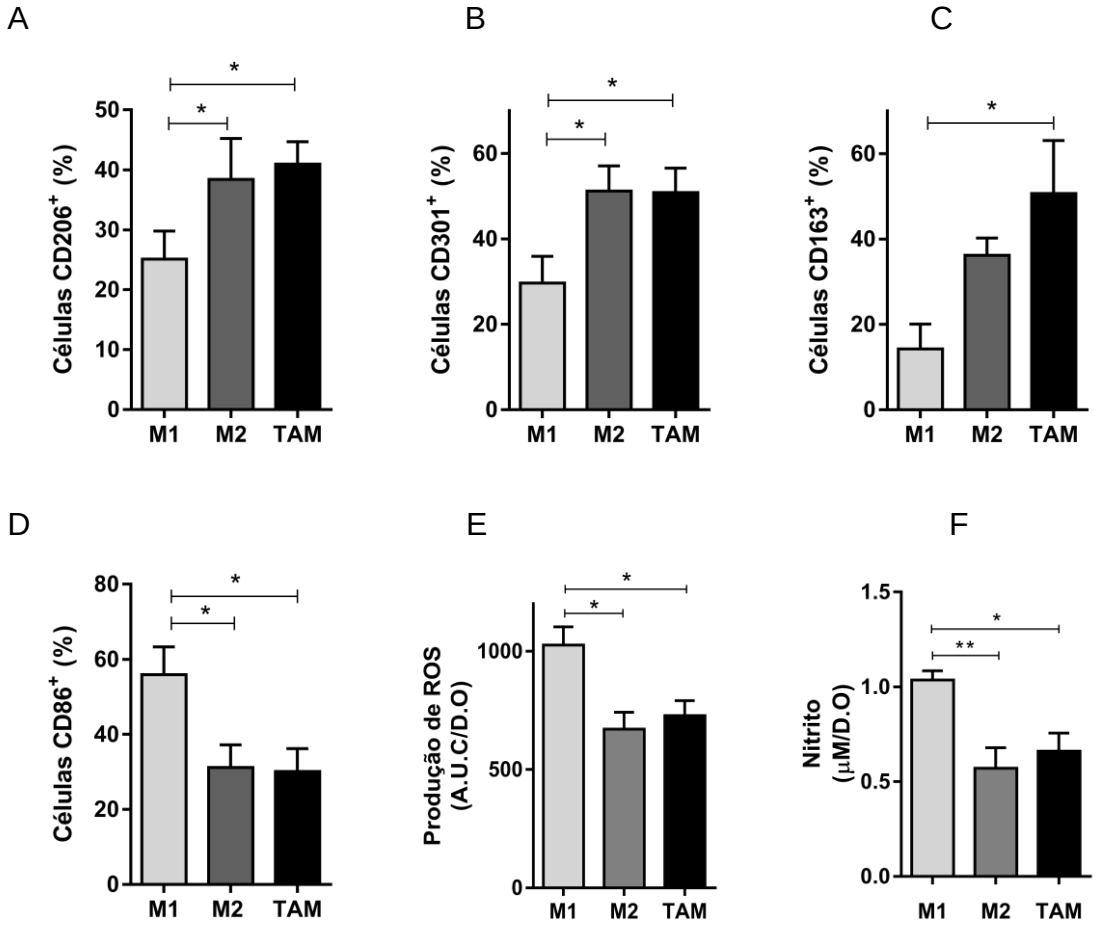
3.1 TAMs apresentam alta expressão de marcadores M2 e baixa expressão de marcadores M1

Para caracterizar o modelo *in vitro* de obtenção dos diferentes fenótipos de macrófagos utilizado neste trabalho, macrófagos derivados de monócitos humanos foram estimulados com LPS + IFN-γ (M1), IL-4 (M2) ou meio condicionado de MV3 (TAM) e marcadores característicos M1 e M2 foram analisados.

Observamos que macrófagos polarizados para o perfil M1 apresentaram baixa porcentagem de células positivas para os marcadores M2: $CD206^+$ (figura 10A), $CD301^+$ (figura 10B) e $CD163^+$ (figura 10C); e alta porcentagem de células positivas para o marcador M1: $CD86^+$ (figura 10D). Além disso, essas células apresentaram alta produção de ROS (figura 10E) e NO (figura 10F), em conformidade com uma eficiente diferenciação M1. Por outro lado, macrófagos polarizados em M2 apresentaram alta porcentagem de células $CD206^+$ (figura 10A), $CD301^+$ (figura 10B) e $CD163^+$ (figura 10C), e baixa porcentagem de células $CD86^+$ (figura 10D), acompanhada de baixa produção de ROS (figura 10E) e NO (figura 10F). Estes dados demonstram que, no nosso modelo, macrófagos M1 e M2 se comportam como esperado e descrito na literatura.

Em concordância com dados já publicados, os TAMs apresentaram alta porcentagem de células $CD206^+$ (figura 10A), $CD301^+$ (figura 10B) e $CD163^+$ (figura 10C), marcadores característicos M2, e baixa porcentagem de células $CD86^+$ (figura 10D), baixa produção de ROS (figura 10E) e NO (figura 10F), marcadores característicos M1. Estes dados validam nosso modelo *in vitro* que será utilizado em todos os próximos experimentos.

Figura 10 - TAMs apresentam alta expressão de marcadores M2 e baixa expressão de marcadores M1



Legenda: Monócitos (2 x 10^5 células/poço) foram semeados em placas de 96 poços durante 7 dias para diferenciação em macrófagos. Após esse período, as células foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) + IFN -γ (100 ng/mL) (M1), IL-4 (40 ng/mL) (M2) ou meio condicionado de MV3 (TAM). Após 72h, as células foram analisadas através de citometria de fluxo utilizando anti-CD206-PE (A), anti-CD301-PE (B), anti-CD163-APC (C) e anti-CD86-APC (D), ou marcadas com luminol para análise da produção de ROS (E). O sobrenadante das células foi coletado para dosagem de nitrito por reação de Griess (F). Os gráficos representam média ± desvio padrão de 4 experimentos realizados separadamente.

Nota: (E) e (F) foram normalizados pela D.O referente à quantidade de células

*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$.

Fonte: A autora, 2019.

3.2 **TAMs apresentam alta atividade glicolítica**

A absorção celular de glicose é mediada pela família de transportadores GLUT, que exibe diferenças na cinética de ativação, especificidade pelo substrato e expressão tecido-específica (Johnson e col., 2012). O GLUT-1 é o principal transportador de glicose em macrófagos e sua expressão é aumentada em macrófagos M1 em relação a macrófagos M2 (Freemerman e col., 2014). Este aumento se correlaciona com um intenso fluxo glicolítico presente em macrófagos M1. Diante disso, comparamos as características metabólicas dos diferentes tipos de macrófagos, M1, M2 e TAMs, analisando a expressão proteica de GLUT-1 e sua localização na membrana, o consumo de glicose, a secreção de lactato, e a expressão gênica da Hexokinase-2.

Observamos que macrófagos polarizados para o perfil M1 apresentaram características glicolíticas: alta expressão de GLUT-1 (figuras 11A e 11B) e a localização deste transportador na superfície da membrana (figura 11C). Isto foi acompanhado foi acompanhado por uma maior captação de glicose (figura 11D) e secreção de lactato (figura 11E). Além disso, observamos ainda, uma maior expressão gênica da Hexokinase-2 (figura 11F), uma enzima chave da via glicolítica, nestes macrófagos inflamatórios. Por outro lado, macrófagos polarizados em M2, apresentaram baixa expressão de GLUT-1 (figura 11A e 11B) e distribuição citosólica deste transportador (figura 11C). Isto foi acompanhado por uma baixa captação de glicose (figura 11D) e secreção de lactato (figura 11E), além de uma baixa expressão gênica da Hexoquinase-2 (figura 10F). Estes dados demonstram que, no nosso modelo, macrófagos M1 e M2 se comportam como esperado e descrito na literatura.

Além disso, observamos que os TAMs, assim como macrófagos M1, apresentaram uma alta expressão de GLUT-1 (figura 11A e 11B), estando também, localizado principalmente na membrana das células (figura 11C). Em adição à alta expressão de GLUT-1, os TAMs apresentaram também alta absorção de glicose (figura 11D) e alta secreção de lactato (figura 11E), em níveis ainda maiores aos observados em macrófagos M1. Corroborando estes dados, os TAMs, de forma semelhante aos macrófagos M1, apresentaram aumento da expressão gênica de

Hexokinase-2 (figura 11F), quando comparado a macrófagos M2. Este conjunto de dados sugerem que os TAMs, diferente dos macrófagos M2, apresentam um intenso fluxo glicolítico, semelhante ao observado em macrófagos inflamatórios M1.

Figura 11 - TAMs apresentam alta atividade glicolítica (continua)

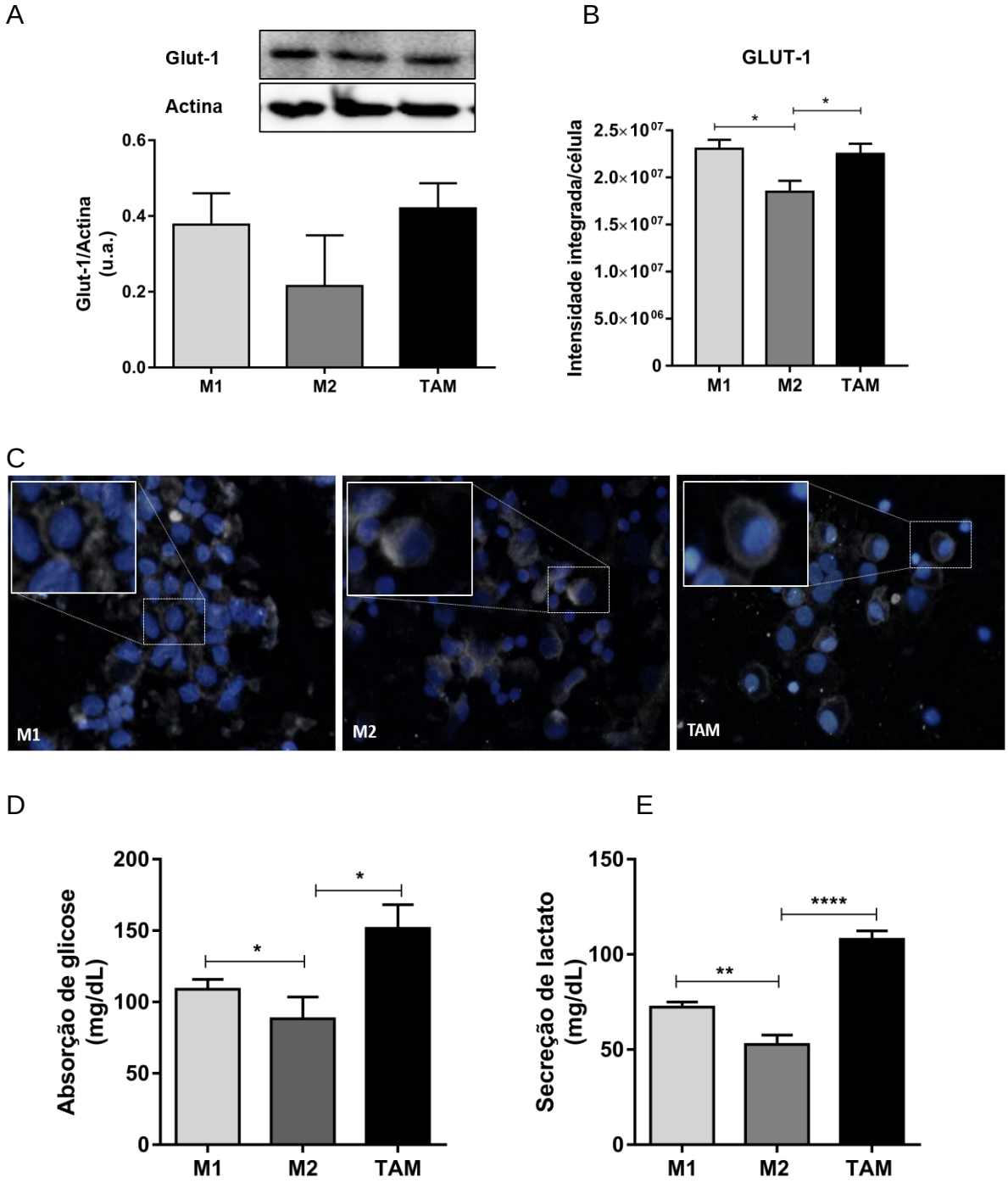
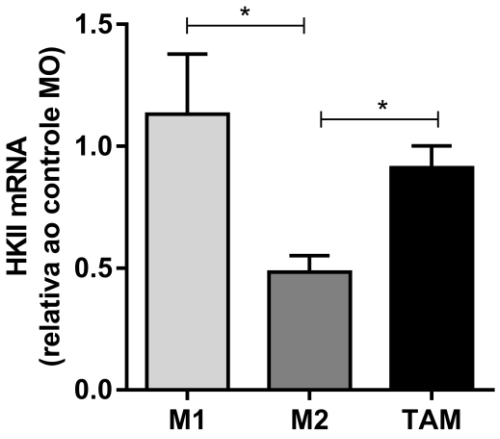


Figura 11 - TAMs apresentam alta atividade glicolítica (conclusão)

F



Legenda: Monócitos foram semeados em placas de 96 (2 x 10^5 células/poço) ou 24 (10^6 células/poço) poços durante 7 dias para diferenciação em macrófagos. Após este período, as células foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) + IFN -ɣ (100 ng/mL) (M1), IL-4 (40 ng/mL) (M2) e meio condicionado de MV3 (TAM). Após 72h, o extrato celular total das células foi obtido para análise da expressão proteica de GLUT-1 por *Western blotting* (A); as células foram marcadas com anti-GLUT-1 conjugado à Alexa488 e analisadas através do leitor de placas confocal ImageXpress Ultra (Molecular Devices), sendo (B) a quantificação proteica de GLUT-1 e (C) a imagem representativa da localização celular do GLUT-1; o sobrenadante das células foi recolhido para dosagem de glicose (D) e lactato (E); O RNA foi extraído para análise da expressão gênica da Hexoquinase-2 (F). Os gráficos representam média ± desvio padrão de 4 experimentos realizados separadamente.

Nota: (A) a actina foi utilizada como controle de carregamento; (B) A quantificação é referente à 4 campos adquiridos por poço de cada grupo em duplicata; (F) O nível de expressão do gene HK-2 analisado foi normalizado por GAPDH. Controle MO: macrófago não polarizado; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ****, $p \leq 0,0001$

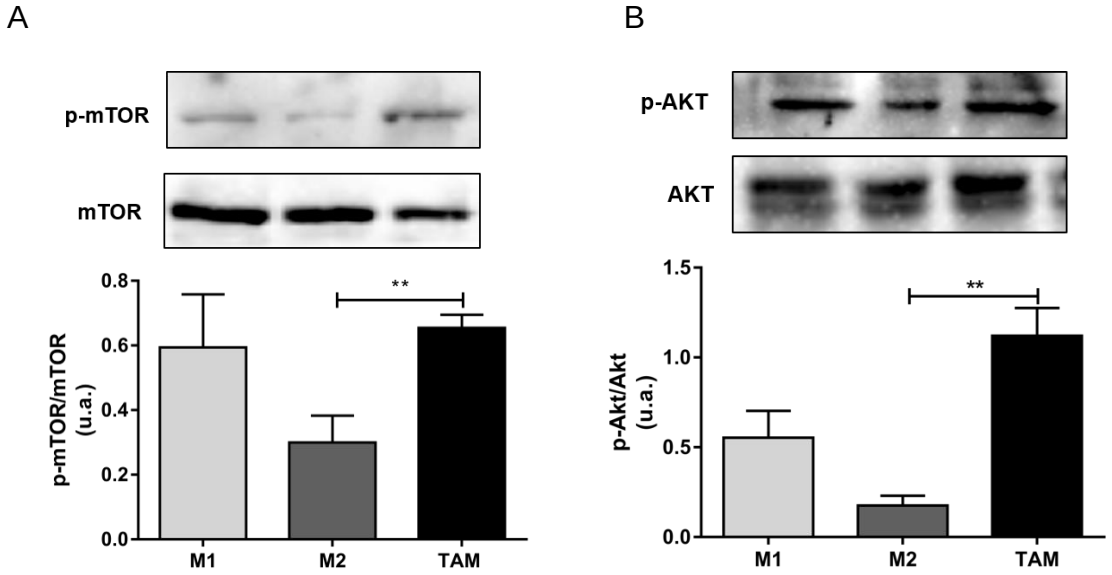
Fonte: A autora, 2019.

3.3 **TAMs apresentam alta ativação da via Akt/mTOR**

A sinalização de Akt/mTOR é fundamental para o crescimento e a sobrevivência das células tumorais. A mTOR ativada atua como um sensor de energia que, com base na disponibilidade de nutrientes, regula processos metabólicos como a glicólise, lipogênese, síntese e transcrição proteica (Laplante & Sabatini, 2012). Além disso, a ativação da mTOR é importante para sustentar o fenótipo glicolítico de células em proliferação e macrófagos M1 (Galván-Peña, & O'Neill, 2015). A serina / treonina quinase Akt é um regulador positivo da mTOR. A Akt ativa mTOR via fosforilação direta e inibição do complexo TSC2, um regulador negativo de mTOR (Hahn-Windgassen e col., 2005). Diante disso, analisamos a fosforilçação da Akt e mTOR nos diferentes subtipos de macrófagos através de *western blotting*.

Na figura 12A, corroborando dados da literatura, observamos que macrófagos M1 apresentam altos níveis de fosforilação de mTOR (p-mTOR) quando comparados aos macrófagos M2. Além disso, observamos que os TAMs apresentam altos níveis de p-mTOR semelhantes aos encontrados em macrófagos M1. Confirmando estes dados, observamos que os TAMs apresentam um aumento da fosforilação de Akt (Ser 473) quando comparados aos macrófagos M2 (figura 12B), sugerindo uma maior ativação desta via, possivelmente para manter o intenso fluxo glicolítico observado nos TAMs.

Figura 12 - TAMs apresentam alta ativação da via Akt/mTOR



Legenda: Monócitos foram cultivados em placa de 24 poços (10^6 cels/poço) durante 7 dias para diferenciação em macrófagos. Após esse período, as células foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) + IFN -ɣ (100 ng/mL) (M1), IL-4 (40 ng/mL) (M2) e meio condicionado de MV3 (TAM). Após 72h, o extrato celular total das células foi obtido para análise da expressão proteica de mTOR e p-mTOR (A) ou AKT e p-AKT (B) por *Western blotting*. Os gráficos representam média ± desvio padrão de 4 experimentos realizados separadamente.

Nota: **, $p \leq 0,01$.

Fonte: A autora, 2019.

3.4 **TAMs apresentam alta fosforilação oxidativa**

Em contraste com as características metabólicas dos macrófagos pró-inflamatórios M1, o fenótipo M2 dos macrófagos é sustentado por um ciclo de *Krebs* intacto e aumento fosforilação oxidativa mitocondrial (Bossche e col., 2017 e Bossche e col., 2016). Para analisar a função mitocondrial, quantificamos as taxas de consumo de oxigênio (OCR) de macrófagos M1, M2 e TAMs através do Seahorse XF-24 Analyzer (Seahorse Bioscience).

As características da fosforilação oxidativa foram calculadas a partir das alterações nas taxas de consumo de oxigênio em resposta a oligomicina, um inibidor da ATP sintase; ao FCCP, um desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial; e à rotenona + antimicina A, inibidores do complexo mitocondrial da cadeia respiratória I e III respectivamente, de acordo com a figura 13A.

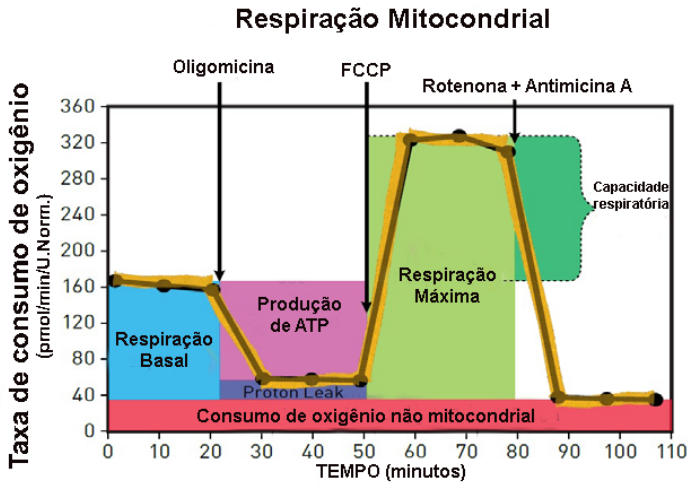
Na figura 13B, observamos que macrófagos M1 apresentaram baixas taxas de consumo de oxigênio, desta forma, respondendo muito pouco às injeções dos inibidores, em contraste ao que ocorre em macrófagos M2. Ao inibir a ATP sintase com a oligomicina, o baixo OCR basal (figura 13C) de macrófagos M1 apresentou uma diminuição muito pequena, indicando uma baixa produção de ATP mitocondrial por estas células (figura 13E), diferente do que ocorreu em macrófagos M2, os quais apresentaram um maior decréscimo da curva, em resposta à oligomicina, indicando uma maior produção de ATP mitocondrial (figura 13E) por estes macrófagos. Além disso, ao desacoplar a fosforilação oxidativa com o FCCP, macrófagos M2 apresentaram um aumento bastante significativo na OCR (OCR máxima) (figura 13D), indicando uma capacidade respiratória alta. Entretanto, macrófagos M1 apresentaram baixa resposta ao FCCP, indicando baixa OCR máxima (figura 13D) e baixa capacidade de respiração. Estes dados, corroborando a literatura, indicam que macrófagos M1 apresentam baixa função mitocondrial, em contraste a macrófagos M2, que apresentam alta função mitocondrial.

Curiosamente, observamos que os TAMs, apesar de apresentarem um fluxo glicolítico aumentado como macrófagos M1, também foram capazes de realizar a fosforilação oxidativa de forma similar ao fenótipo M2 (fig 13B), apresentando alta taxa basal (figura 13C) e máxima (figura 13D) de consumo de oxigênio (OCR). Além

disso, observamos que os TAMs, de forma semelhante a macrófagos M2, apresentaram uma alta produção de ATP mitocondrial (figura 13E).

Figura 13 - TAMs apresentam alta fosforilação oxidativa (continua)

A



B

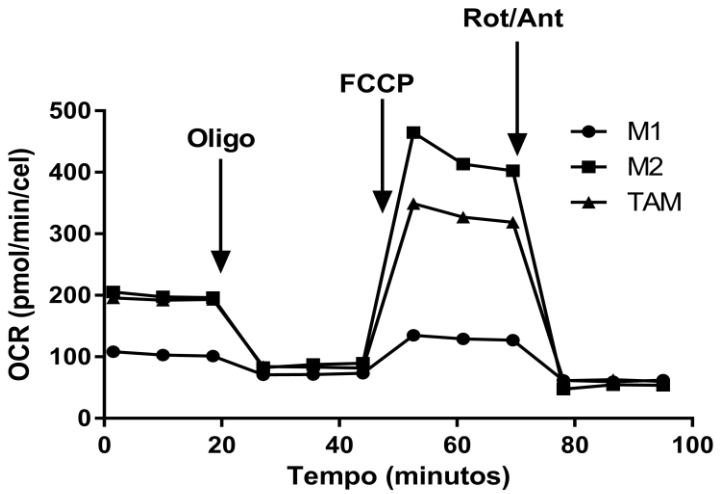
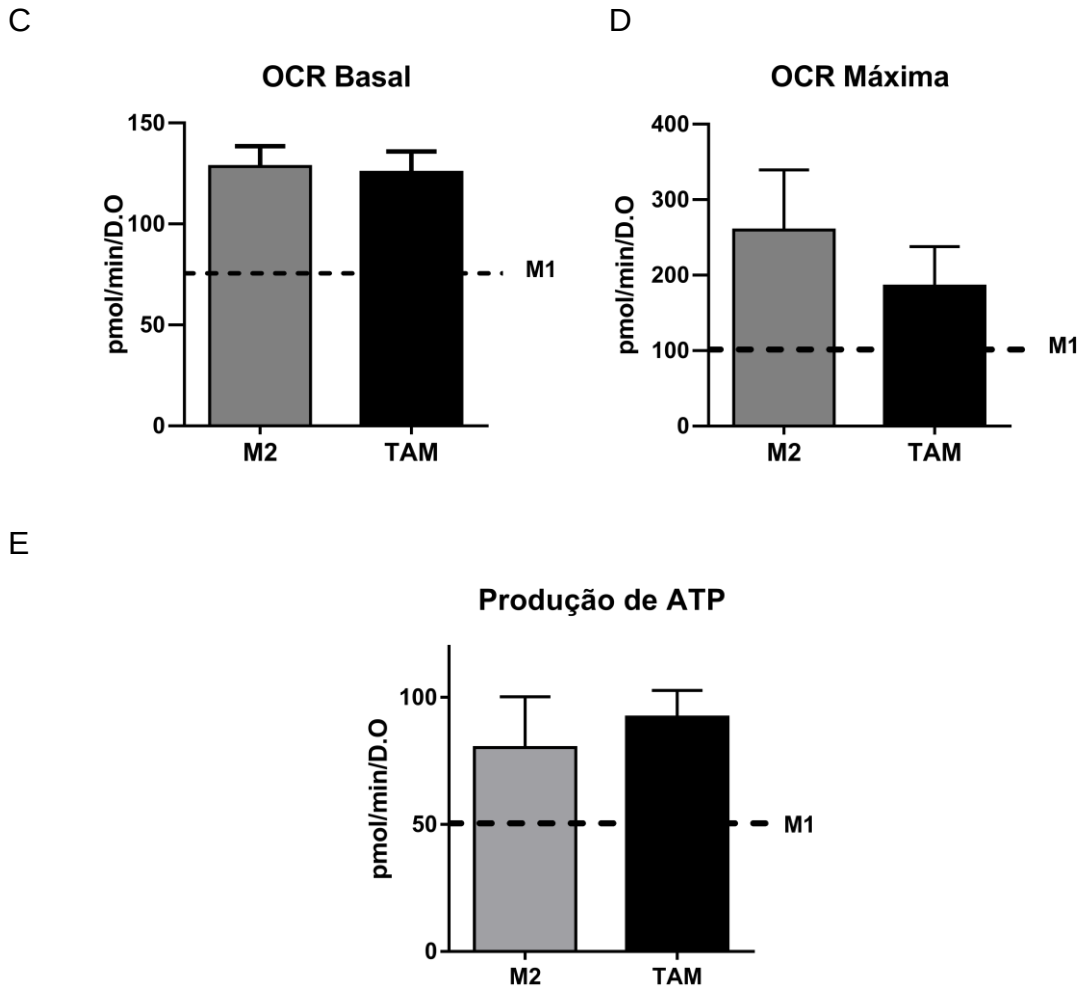


Figura 13 - TAMs apresentam alta fosforilação oxidativa (conclusão)



Legenda: Macrófagos (2,5 x 10^5) M1, M2 ou TAMs foram plaqueados em placas de cultura XF-24 (Seahorse Bioscience) por 24 horas. Após este período, as células foram incubadas com RPMI sem vermelho de fenol por 1 hora e a taxa de consumo de oxigênio (OCR) foi avaliada no *Seahorse Flux Analyzer* XF-24 (Seahorse Bioscience) durante 100 minutos, realizando a injeção de oligomicina (1 µM) no 20° minuto, de FCCP (0,9 µM) no 40° minuto, e de um mix contendo rotenona + antimicina A (1 µM) no 80° minuto (B); (C) OCR basal; (D) OCR máxima; (E) produção de ATP. Os gráficos C, D e E, representam média ± desvio padrão de 3 experimentos realizados separadamente.

Nota: As caracterticas da fosforilação oxidativa foram calculadas a partir das alterações nas taxas de consumo de oxigênio em resposta a oligomicina (Oligo), FCCP e rotenona + antimicina A (Rot/Ant). A OCR foi normalizada pela D.O referente à quantidade de células.

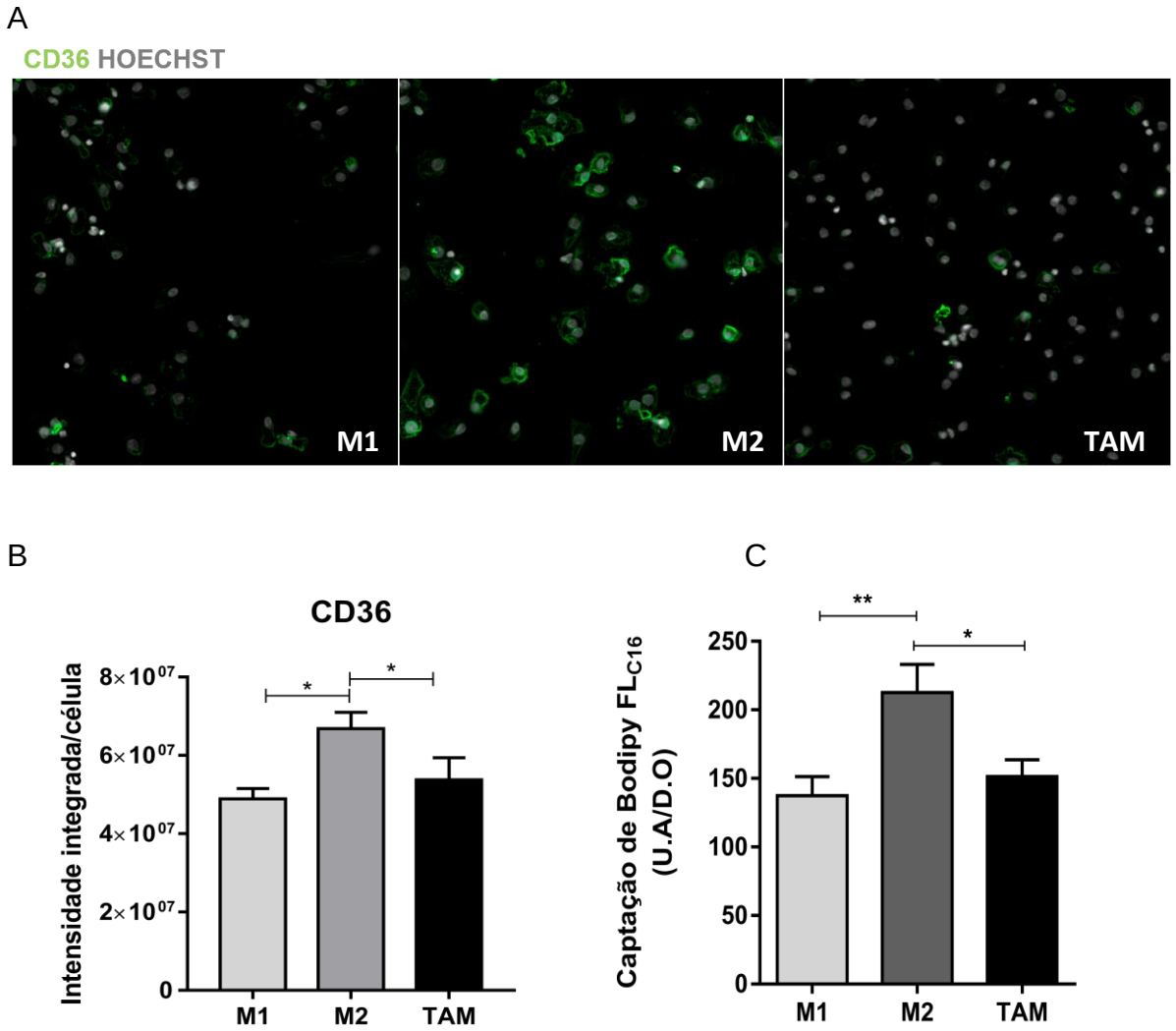
Fonte: A autora, 2019.

3.5 **TAMs apresentam baixa captação de ácidos graxos**

Em macrófagos, sinais inflamatórios, incluindo LPS e IFNγ, que são necessários para gerar o fenótipo M1, induzem a síntese de ácidos graxos, enquanto que a diferenciação de macrófagos M2 envolve a oxidação de ácidos graxos (FAO) (Remmerie & Scott, 2018). O receptor *scavenger* CD36 desempenha um papel fundamental no fornecimento de lipoproteínas para lisossomos, liberando ácidos graxos e tornando-os disponíveis para β-oxidação na mitocôndria (Vats e col., 2006; Huang e col., 2014). Diante disso, como características da FAO, analisamos a expressão proteica de CD36 e a captação exógena de ácidos graxos em macrófagos M1, M2 e TAMs.

Em nossos dados, observamos que macrófagos M2 possuíram uma maior expressão de CD36 (figura 14A e 14B) e uma consequente maior absorção de palmitato (Bodipy FL_{C16}) exógeno (figura 14C), quando comparado a macrófagos M1, corroborando dados da literatura. Além disso, observamos que os TAMs apresentaram baixa expressão do receptor CD36 (figura 14A e figura 14B) e baixa captação de palmitato exógeno (figura 14C), de forma semelhante aos macrófagos M1. Estes dados sugerem que os TAMs, diferente de macrófagos M2 e semelhante a macrófagos M1, apresentam baixa absorção e oxidação de ácidos graxos.

Figura 14 - TAMs apresentam baixa captação de ácidos graxos



Legenda: Monócitos foram semeados em placas de 96 poços preta (2 x 10^5) durante 7 dias para diferenciação em macrófagos. Após esse período, as células foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) + IFN -ɣ (100 ng/mL) (M1), IL-4 (40 ng/mL) (M2) e meio condicionado de MV3 (TAM). Após 72h, as células foram marcadas com anti-CD36 conjugado à Alexa488 e analisadas através do leitor de placas confocal ImageXpress Ultra (Molecular Devices), e do software MetaXpress (Molecular Devices), sendo (A) a imagem representativa da expressão total de CD36 e (B) a quantificação proteica de CD36; Bodipy FL_{c16} (5 mM) foi adicionado à cultura de célula por 30 min, após este tempo, os poços foram lavados e a fluorescência referente ao Bodipy FL_{C16} absorvido pelas células (C) foi analisada através de leitor de placa (Envision-Perkin-Elmer®) e normalizada pela D.O referente à quantidade de células

Nota: A quantificação (A) é referente à 4 campos adquiridos por poço de cada grupo em duplicata; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$.

Fonte: A autora, 2019.

3.6 **A inibição da via glicolítica altera o fenótipo M2 dos TAM**

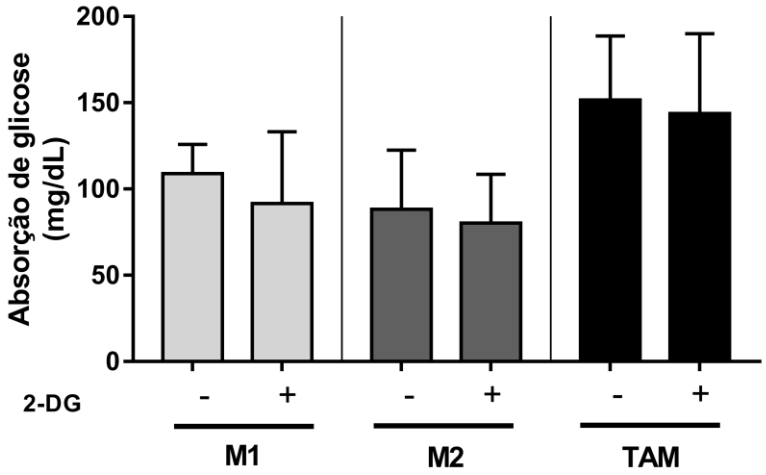
A polarização de macrófagos nos fenótipos M1 e M2 é apoiada criticamente por alterações metabólicas intracelulares. No entanto, os requisitos metabólicos para a polarização em TAMs ainda não foram bem estabelecidos. Até o momento, nossos resultados sugerem que TAMs apresentam um perfil metabólico altamente glicolítico, com alto consumo de glicose e secreção de lactato, mas, também apresentando alta fosforilação oxidativa. Diante disso, analisamos a contribuição do metabolismo glicolítico presente nos TAMs para a manutenção do seu perfil fenotípico. Para isso, as células foram tratadas com 2-DG, um análogo de glicose, que inibe a glicólise através da competição com hexoquinase.

Observamos que o tratamento com 2-DG não afetou o consumo de glicose em nenhum perfil de macrófago (figura 15A), embora tenha sido capaz de diminuir a secreção de lactato pelos macrófagos M1 e TAMs (figura 15B).

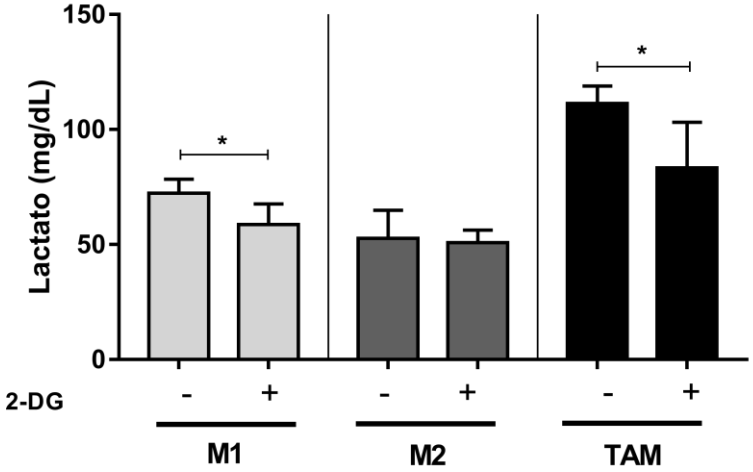
Macrófagos M1 tratados com 2-DG apresentaram diminuição da porcentagem de células $CD86^+$ (figura 15C), sugerindo que a glicólise aeróbica é essencial para manter a polarização M1. Por outro lado, a porcentagem de células $CD206^+$ (figura 15D) e $CD301^+$ (figura 15E) em macrófagos M1 não foi alterada pelo tratamento com 2-DG. Já em macrófagos M2 tratados com 2-DG não houve alteração das proporções de células $CD86^+$ (figura 15C), $CD206^+$ (figura 15D) e $CD301^+$ (figura 15E). Observamos ainda que a evidente porcentagem de células $CD206^+$ e $CD301^+$ em TAMs foi significativamente diminuída, alcançando níveis comparáveis aos observados nos macrófagos M1, enquanto a porcentagem de células $CD86^+$ permaneceu baixa, sugerindo que a manutenção do fluxo glicolítico elevado em TAMs suporta o seu fenótipo tipo M2.

Figura 15 - A inibição da via glicolítica altera o fenótipo M2 dos TAMs (continua)

A



B



C

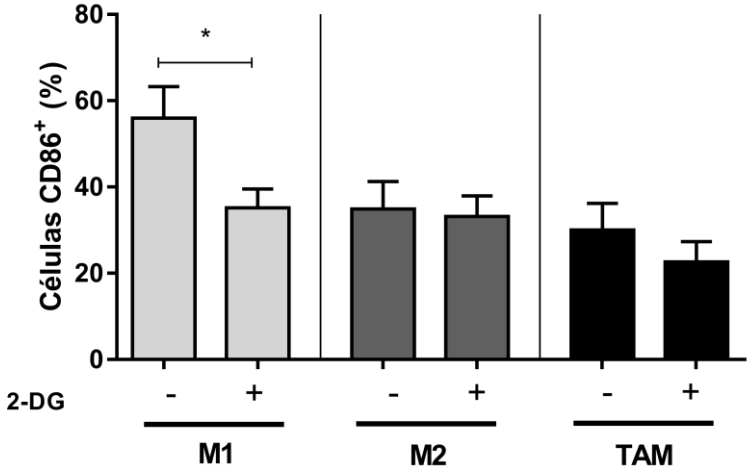
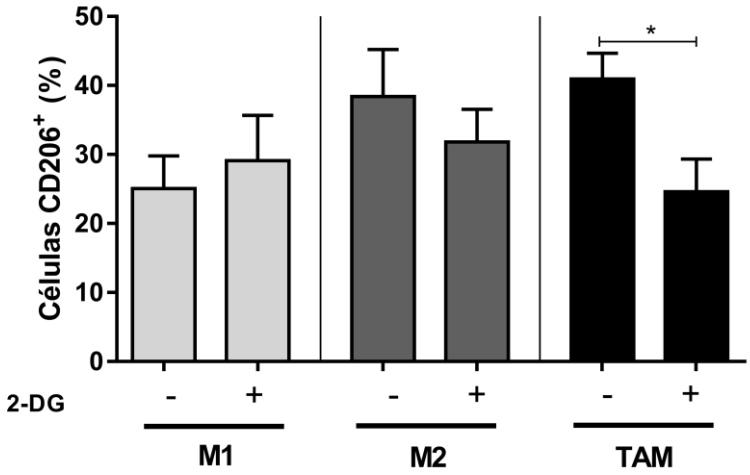
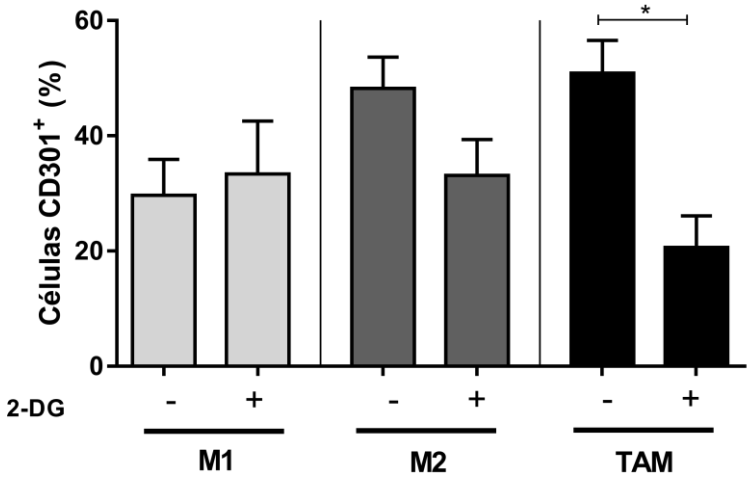


Figura 15 - A inibição da via glicolítica altera o fenótipo M2 dos TAM (conclusão)

D



E



Legenda: Monócitos (2 x 10^5 células/poço) foram cultivados em placas de 96 poços durante 7 dias para diferenciação em macrófagos. Após esse período, as células foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) + IFN -ɣ (100 ng/mL) (M1), IL-4 (40 ng/mL) (M2) e meio condicionado de MV3 (TAM) por 72 horas e tratadas ou não com 2-DG (1 mM). Após 72h, o sobrenadante das células foi coletado para dosagem de glicose (A) e lactato (B); e as células foram analisadas através de citometria de fluxo utilizando anti-CD86-APC (C), anti-CD206-PE (D) e anti-CD301-PE (E). Os gráficos representam média ± desvio padrão de 4 experimentos realizados separadamente.

Nota: *, $p \leq 0,05$.

Fonte: A autora, 2019.

3.7 **A inibição da fosforilação oxidativa não altera o fenótipo dos TAM**

Já está bem descrito na literatura que macrófagos M1 possuem uma maior atividade glicolítica, enquanto macrófagos M2 utilizam a fosforilação oxidativa para produção de ATP (Van Den Bossche e col., 2017). Em nossos resultados, vimos que os TAMs possuem um aumento de características glicolíticas, como o aumento da expressão de GLUT-1, do consumo de glicose e secreção de lactato, além de serem capazes de realizar respiração mitocondrial. Diante disso, analisamos o envolvimento da fosforilação oxidativa na manutenção do perfil dos TAMs.

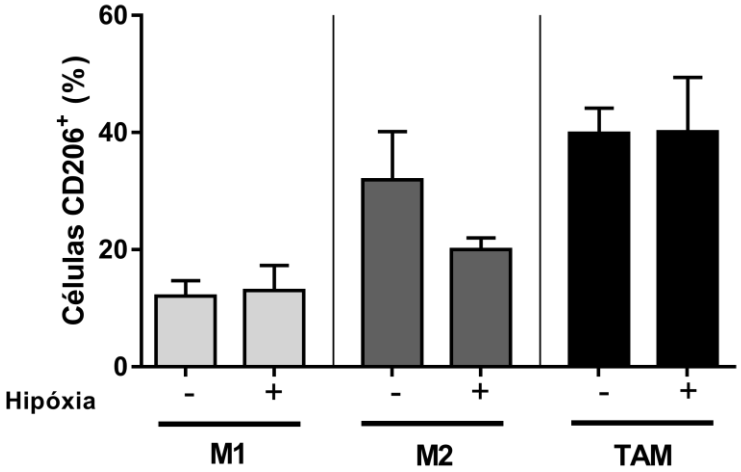
Metabolicamente, a fosforilação oxidativa pode ser inibida pela diminuição do aporte de oxigênio no ambiente. O oxigênio é crítico para a respiração celular aeróbica, uma vez que serve como o aceptor final na cadeia de transporte de elétrons (CTE). Assim, a falta de oxigênio em condições hipóxicas inibe a CTE, o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa.

Para avaliar a contribuição do metabolismo oxidativo para a polarização TAM, analisamos o fenótipo dos diferentes subtipos de macrófagos submetidos a condições hipóxicas. Observamos que macrófagos M2 foram afetados quando mantidos em baixas concentrações de oxigênio (0,5% O_2), diminuindo a porcentagem de células $CD206^+$ (figura 16A) e aumentando a de células $CD86^+$ (figura 16B). Essa alteração do perfil de marcadores M2 é concomitante a um aumento na produção de lactato, indicando uma mudança da utilização oxidativa da glicose para a fermentação lática (figura 16C). Em contraste, os macrófagos M1 foram capazes de manter as porcentagens de células $CD86^+$ (figura 16A) e $CD206^+$ (figura 16B), e produção de lactato (figura 16C) inalteradas sob hipóxia, confirmando sua independência da fosforilação oxidativa.

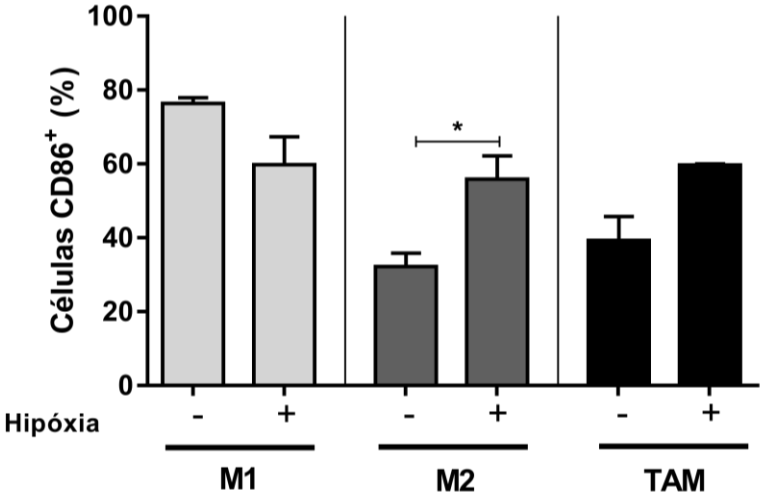
Por sua vez, os TAMs submetidos à hipóxia também foram capazes de manter a porcentagem de células $CD206^+$ (figura 16B) e $CD86^+$ (figura 16A), bem como sua secreção de lactato aumentada (figura 16C), sugerindo que, apesar dos TAMs serem capazes de executar a fosforilação oxidativa, esta via não é essencial para a manutenção da sua polarização M2.

Figura 16 - A inibição da fosforilação oxidativa não altera o fenótipo dos TAMs

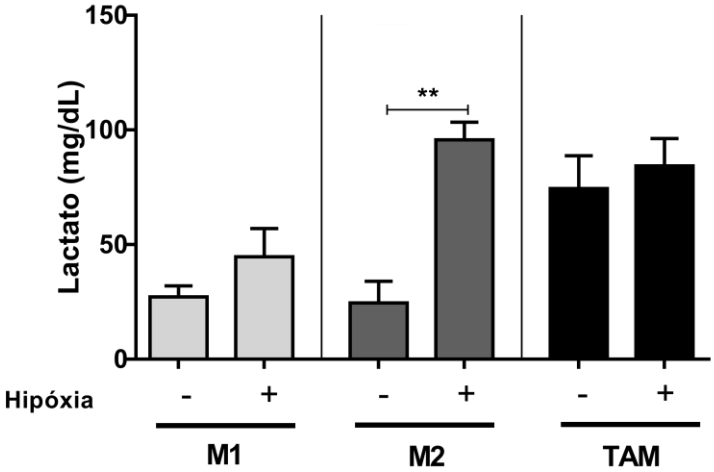
A



B



C



Legenda: Monócitos (10^6 células/poço) foram cultivados em placas de 24 poços durante 7 dias para diferenciação em macrófagos. Após esse período, as células foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) + IFN -ɣ (100 ng/mL) (M1), IL-4 (40 ng/mL) (M2) e meio condicionado de MV3

(TAM) por 72 horas e submetidas ou não à hipóxia por 12h em estufa à 37° C. As células foram analisadas através de citometria de fluxo utilizando anti-CD206-PE (A) e anti-CD86-APC (B); o sobrenadante das células foi coletato para dosagem lactato (C); os gráficos representam média ± desvio padrão de 4 experimentos realizados separadamente.

Nota: *, $p \leq 0,05$.

Fonte: A autora, 2019.

3.8 **A inibição da via das pentoses fosfato não altera o fenótipo dos TAMs**

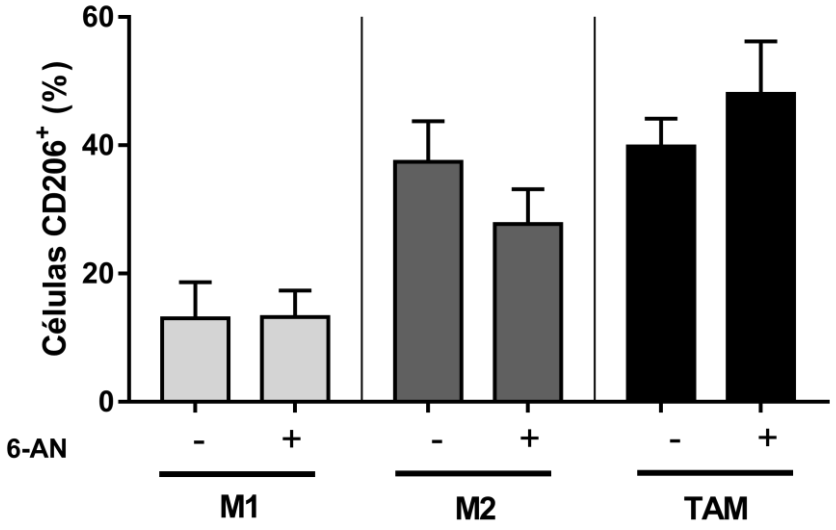
Já está bem descrito na literatura que macrófagos M1 utilizam a via das pentoses fosfato no seu metabolismo (Van Den Bossche e col., 2017). Esta via suporta a síntese de NADPH necessária para a geração de ROS pelo sistema NADPH oxidase e para geração de NO pela iNOS (Ganeshan & Chawla, 2014). A fim de analisar a participação desta via no metabolismo dos TAMs, os diferentes subtipos de macrófagos foram tratados com 6-AN, um inibidor da via das pentoses. Em seguida, a porcentagem de células positivas para marcadores M2, como CD206 (figura 17A) e CD301 (figura 17B), e marcadores M1 como CD86 (figura 17C) e a produção de ROS (figura 17D) e NO (figura 17E) foram analisadas.

Corroborando dados da literatura que mostram o alto fluxo pela via das pentoses em macrófagos M1, observamos que a inibição desta via leva à diminuição da porcentagem de células $CD86^+$ (figura 17C), e da produção de ROS (figura 17D) e de NO (figura 17E) neste subtipo de macrófago. Entretanto, a porcentagem de células positivas para marcadores M2, como CD206 (figura 17A) e CD301 (figura 17B) permaneceu inalterada. Em contraste ao observado em macrófagos M1, como esperado, a inibição da via das pentoses no subtipo M2, não alterou nenhuma de suas características, como a alta porcentagem de células positivas para marcadores M2 (CD206 e CD301) (figuras 17A e 17B) e a baixa porcentagem de células $CD86^+$ (figura 17C), produção de ROS (figura 17D) e de NO (figura 17E), características clássicas M1.

Além disso, observamos que, de forma semelhante aos macrófagos M2, a inibição da via das pentoses em TAMs também não foi capaz de alterar suas características M2, como a alta porcentagem de células $CD206^+$ e $CD301^+$ (figuras 17A e 17B), a baixa porcentagem de células $CD86^+$ (figura 17C) e a baixa produção de ROS (figura 17D) e de NO (figura 17E). Esses dados sugerem que TAMs, assim como macrófagos M2, não dependem do fluxo pela via das pentoses para manter seu perfil de marcadores, e que apenas os macrófagos M1 são dependentes do fluxo de substrato por essa via.

Figura 17 - A inibição da via das pentoses fosfato não altera o fenótipo dos TAMs (continua)

A



B

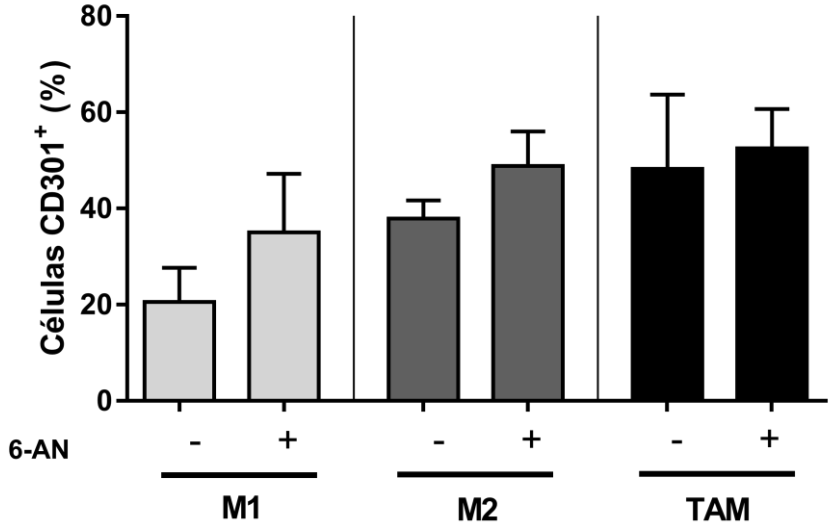
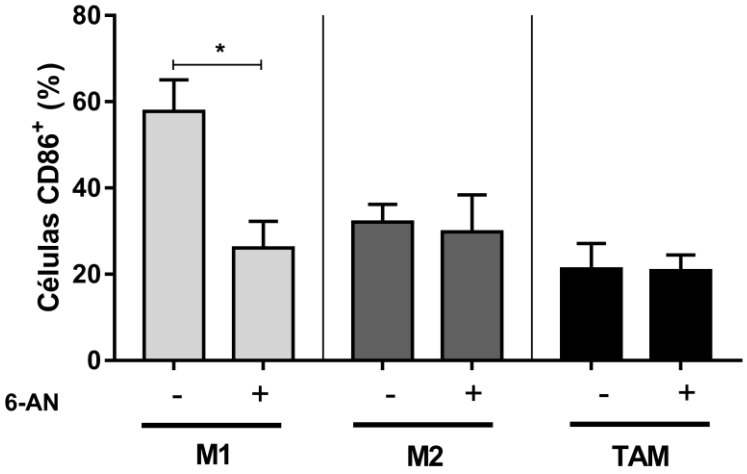
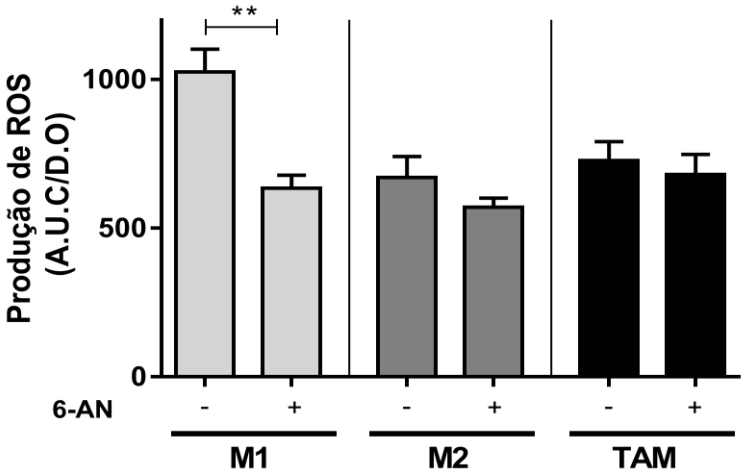


Figura 17 - A inibição da via das pentoses fosfato não altera o fenótipo dos TAMs (conclusão)

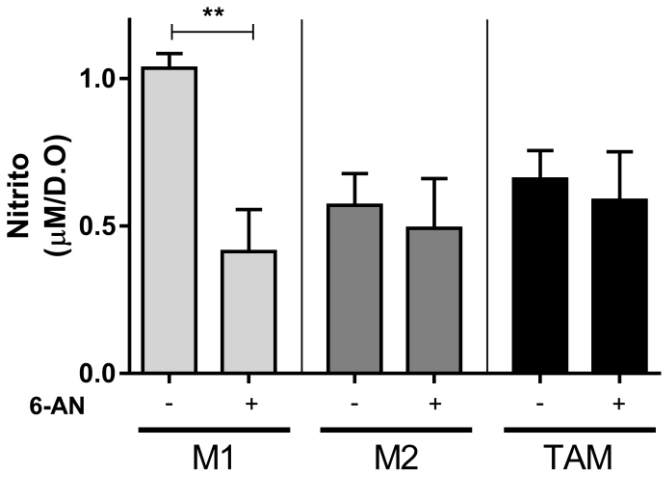
C



D



E



Legenda: Monócitos (2 x 10^5 células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços durante 7 dias para diferenciação em macrófagos. Após esse período, as células foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) + IFN -ɣ (100 ng/mL) (M1), IL-4 (40 ng/mL) (M2) e meio condicionado de MV3 (TAM) por 72 horas. As células foram analisadas através de citometria de fluxo utilizando anti-CD206-PE (A), anti-CD301-PE (B) e anti-CD86-APC (C), ou marcadas com luminol (50 µM) para análise da produção de ROS (D); o sobrenadante das células foi coletato para dosagem de nitrito por reação de Griess (E). Os gráficos representam média ± desvio padrão de 4 experimentos realizados separadamente.

Nota: (D) e (E) foram normalizados pela D.O referente à quantidade de células; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$.

Fonte: A autora, 2019.

3.9 **O tratamento com ATL não altera o metabolismo glicolítico dos TAMs**

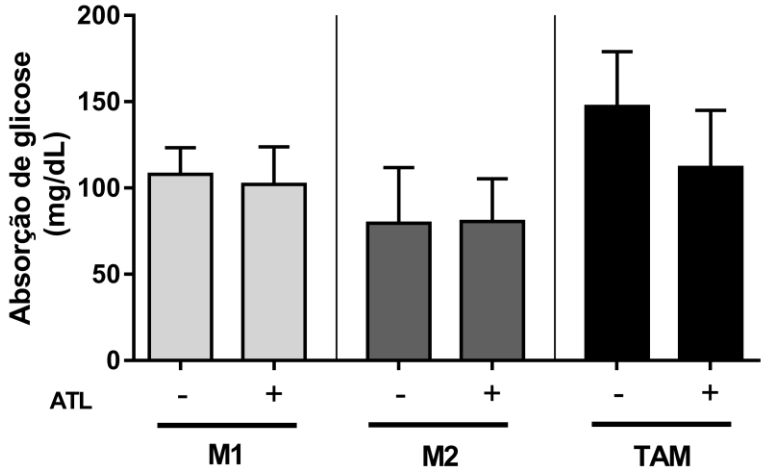
Estudos anteriores do nosso grupo demonstram que o tratamento com um análogo de 15-epi-lipoxina (ATL) é capaz de alterar o perfil M2-*like* dos TAMs em direção à um perfil M1-*like* com características mais citotóxicas, levando as células tumorais à apoptose (Simões e col., 2017). No entanto, o efeito do ATL sobre o metabolismo dos TAMs ainda precisa ser elucidado. Diante disso, inicialmente analisamos o efeito do ATL sobre o perfil glicolítico dos TAMs, analisando características como a absorção de glicose, secreção de lactato, expressão gênica da HK-II, e a expressão proteica total de GLUT-1.

Observamos que o tratamento com ATL não teve efeito sobre o consumo de glicose (figura 18A), a secreção de lactato (figura 18B), ou sobre a expressão gênica da HK-II (figura 18C) em nenhum subtipo de macrófago analisado. Entretanto, o tratamento com ATL em TAMs diminuiu a expressão proteica total de GLUT-1 (figura 18D). Apesar de estatisticamente diferente, a diminuição não parece significante, visto que não foi observado dimuição da absorção de glicose por essas células.

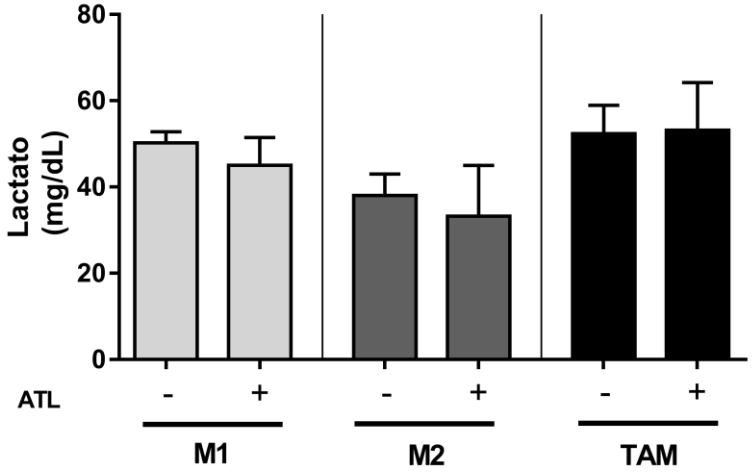
Este conjunto de dados sugere que o tratamento com o ATL não é capaz de alterar o alto metabolismo glicolítico dos TAMs. Além disso, o tratamento com ATL não possuiu efeito sobre o metabolismo glicolítico de macrófagos M1 e M2.

Figura 18 - O tratamento com ATL não altera o metabolismo glicolítico dos TAMs (continua)

A



B



C

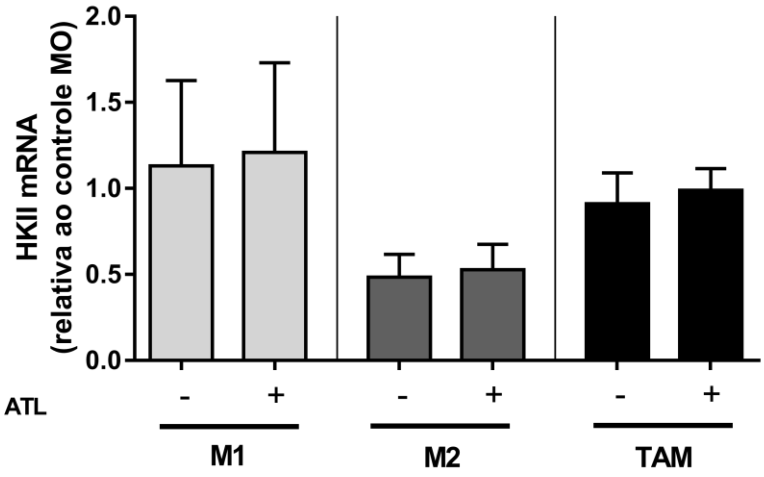
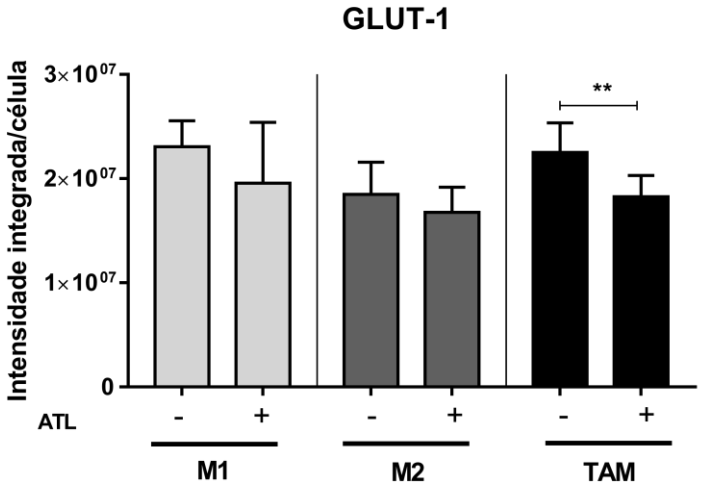


Figura 18 - O tratamento com ATL não altera o metabolismo glicolítico dos TAMs (conclusão)

D



Legenda: Monócitos foram cultivados em placas de 96 (2 x 10^5) ou 12 (3 x 10^6) poços durante 7 dias para diferenciação em macrófagos. Após esse período, as células foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) + IFN -ɣ (100 ng/mL) (M1), IL-4 (40 ng/mL) (M2) e meio condicionado de MV3 (TAM) por 72 horas e tratados ou não com ATL (10 nM). Após 72h, o sobrenadante das células foi recolhido para dosagem de glicose (A) e lactato (B); o RNA foi extraído para análise da expressão gênica de HK-II (C); as células foram marcadas com anti-GLUT-1 conjugado à Alexa488 e analisadas através do leitor de placas confocal ImageXpress Ultra (Molecular Devices), sendo (D) a quantificação proteica total de GLUT-1. Os gráficos representam média ± desvio padrão de 4 experimentos realizados separadamente.
Nota: (C) O nível de expressão do gene HK-II analisado foi normalizado por GAPDH. A quantificação (D) é referente à 4 campos adquiridos por poço de cada grupo em duplicata **, $p \leq 0,01$.
Fonte: A autora, 2019.

3.10 **O tratamento com ATL induz a forma monomérica da PKM2 e sua translocação para o núcleo**

Estudos indicam que a PKM2, quando altamente expressa, existe em um equilíbrio entre dímeros (ou monômeros) de piruvato quinase, enzimaticamente inativos e que podem translocar para o núcleo (Hitosugi e col., 2009), e tetrâmeros enzimaticamente ativos que são retidos no citosol (Mazurek e col., 2005). Já está bem descrito na literatura que, em macrófagos ativados com LPS, a forma monomérica e menos enzimaticamente ativa da PKM2 está mais expressa, sendo esta translocada para o núcleo onde regula a atividade transcricional do HIF-1α, responsável pela transcrição de diversos genes pró-inflamatórios. Além disso, a

diminuição da atividade enzimática da PKM2, promove um aumento no fluxo de intermediários glicolíticos em direção a vias biossintéticas, como a via das pentoses fosfato, desviando desta forma o piruvato do ciclo de *Krebs*. Por outro lado, a indução da forma tetramérica é capaz de diminuir o perfil M1 induzido por LPS e promover características típicas de macrófagos M2, como a indução de IL-10 (Palsson-McDermott e col., 2015).

Diante disso, analisamos a expressão da PKM2 sob suas diferentes formas, através de um ensaio de *crosslinking* seguido por *western blotting*, e sua translocação para o núcleo, através de imunocitoquímica, nos diferentes subtipos de macrófagos, e o efeito do ATL sobre a expressão e translocação desta enzima.

Podemos observar que, em concordância com a literatura, macrófagos M1 apresentaram maior expressão da PKM2 em sua forma monomérica (figura 19A) e maior translocação desta enzima para o núcleo (figura 19B), enquanto macrófagos M2 apresentaram uma menor expressão de monômeros de PKM2 (figura 19A) e menor translocação núcleo (figura 19B). Além disso, observamos que, de forma semelhante aos macrófagos M2, TAMs apresentaram baixa expressão da PKM2 monomérica (figura 19A), e sua translocação para o núcleo nessas células foi em taxas ainda mais baixas (figura 19B).

Observamos ainda que o tratamento com ATL não teve efeito sobre os níveis de expressão da PKM2 monomérica, nem sobre a sua translocação para núcleo em macrófagos M1 e M2. Entretanto, em TAMs, o tratamento com o ATL foi capaz de induzir a expressão de monômeros de PKM2, além de induzir também, a translocação nuclear desta enzima (figuras 19A e 19B). Estes dados sugerem uma possível alteração na forma como é utilizado o carbono da via glicolítica, podendo este ser desviado para outras vias, como a via das pentoses fosfato.

Figura 19 - O tratamento com ATL induz a forma monomérica da PKM2 e sua translocação para o núcleo (continua)

A

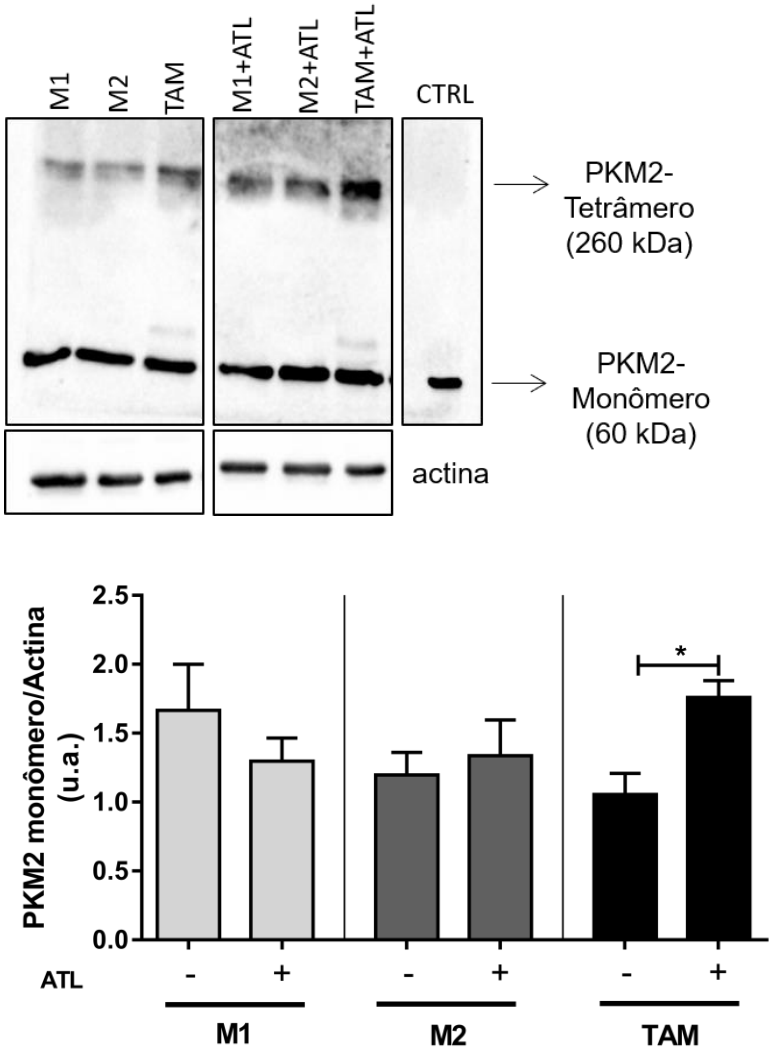
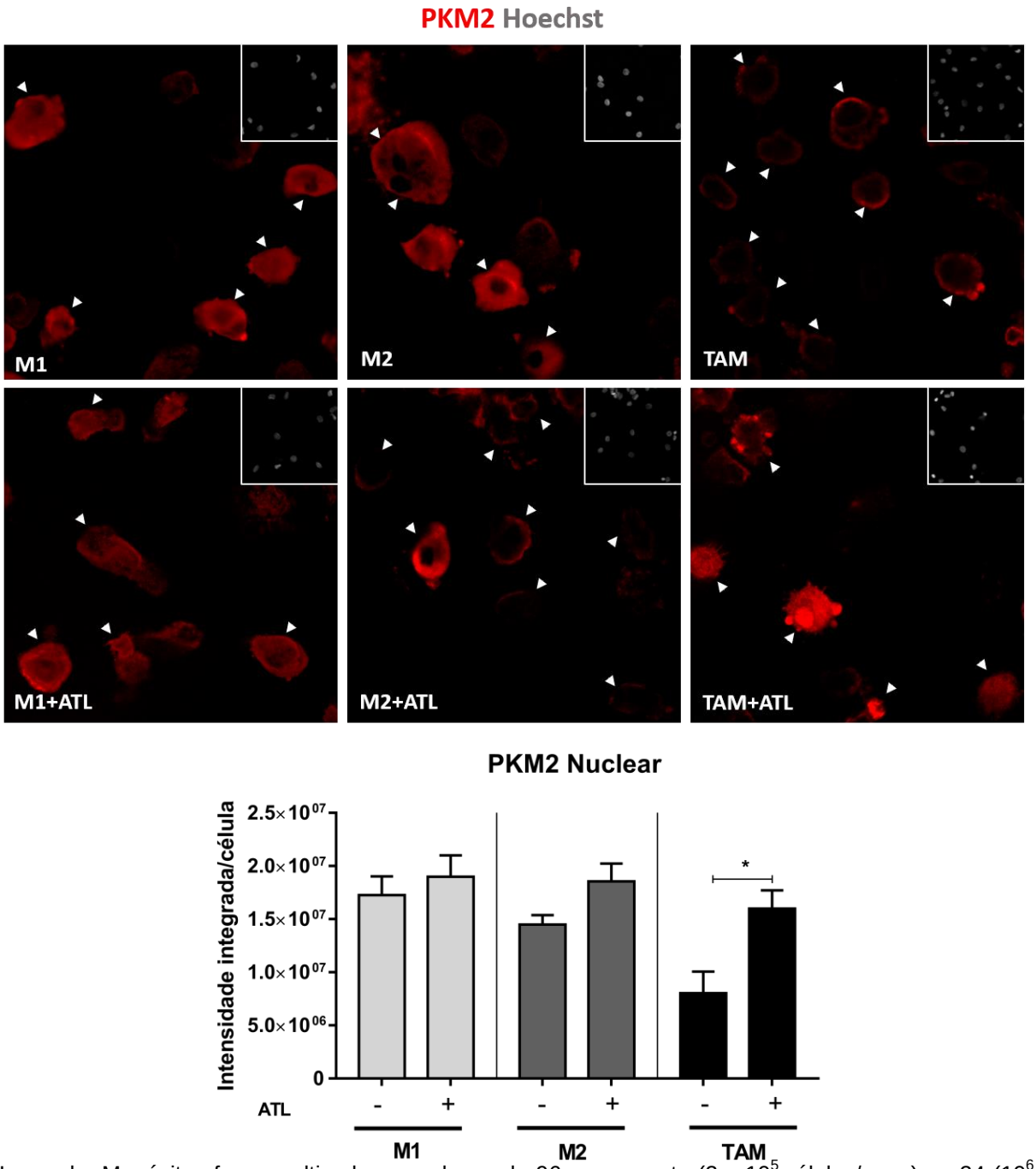


Figura 19 - O tratamento com ATL induz a forma monomérica da PKM2 e sua translocação para o núcleo (conclusão)

B



Legenda: Monócitos foram cultivados em placas de 96 poços preta (2 x 10^5 células/poço) ou 24 (10^6 células/poço) poços durante 7 dias para diferenciação em macrófagos. Após esse período, as células foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) + IFN -ɣ (100 ng/mL) (M1), IL-4 (40 ng/mL) (M2) e meio condicionado de MV3 (TAM) por 72 horas e tratados ou não com ATL (10 nM). Após 72h, as células foram incubadas com DSS (500 µM) por 30 minutos para a realização do *crosslinking*, o extrato celular total das células foi obtido para análise da expressão proteica de PKM2 (A); as células foram marcadas com anti-PKM2 conjugado à Alexa488 e sua translocação para o núcleo (marcado com hoechst) analisadas através da captura de imagens pelo leitor de placas confocal ImageXpress Ultra (Molecular Devices), e

análise através da utilização de algoritmo pré-determinado para ensaio de translocação nuclear no software MetaXpress (Molecular Devices), sendo a figura (B) a imagem representativa da expressão da PKM2 e o gráfico da quantificação proteica nuclear de PKM2. Quadrado maior: PKM2 em vermelho; quadrado menor: núcleos em cinza. Os gráficos representam média ± desvio padrão de 4 experimentos realizados separadamente.

Nota: (A) *Blotting* representativo contendo grupo CTRL (controle) sem tratamento com DSS e gráfico quantitativo de 4 experimentos. (B) A quantificação é referente à 4 campos adquiridos por poço de cada grupo em duplicata *, $p \leq 0,05$.

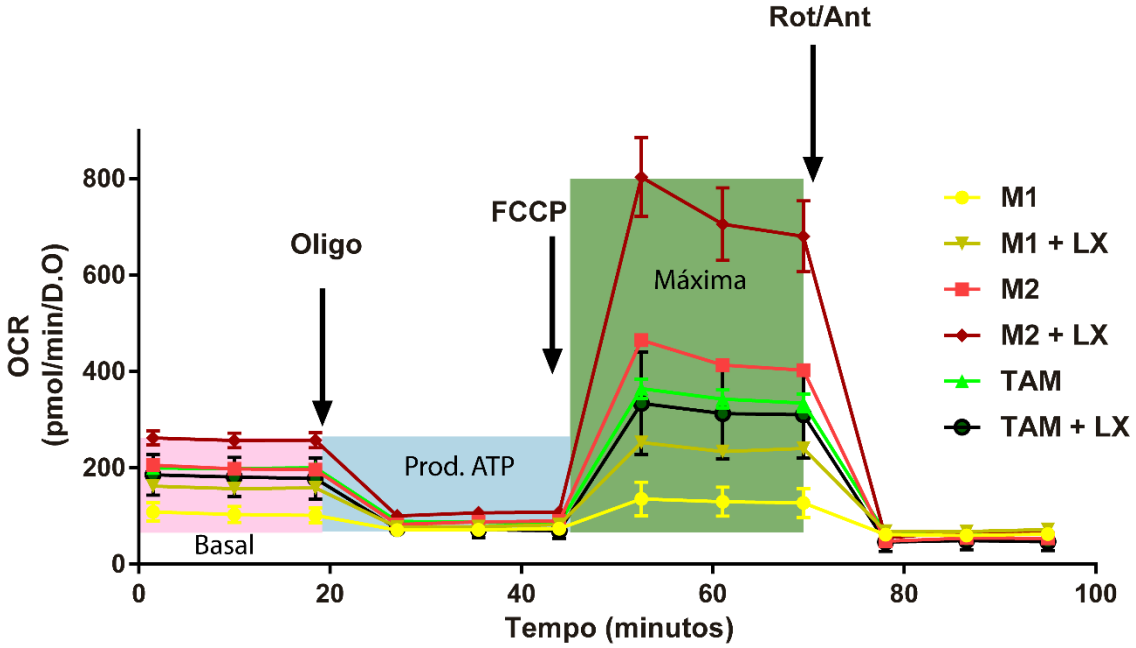
Fonte: A autora, 2019.

3.11 **O tratamento com ATL não altera o metabolismo oxidativo dos TAMs**

Como observado anteriormente em nossos resultados, apesar de apresentarem intenso fluxo glicolítico de forma similar a macrófagos M1, TAMs apresentam também atividade oxidativa mitocondrial semelhante a macrófagos M2. Desta forma, analisamos o efeito do ATL sobre a atividade mitocondrial, nos diferentes subtipos de macrófagos, através da quantificação das taxas de consumo de oxigênio (OCR) pelo Seahorse XF-24 Analyzer (Seahorse Bioscience).

Na figura 20, observamos que o tratamento com ATL em macrófagos M1 foi capaz de induzir um aumento na função mitocondrial destas células, induzindo a OCR basal, a produção de ATP mitocondrial e capacidade respiratória máxima. De forma semelhante, porém em maior intensidade, o tratamento com ATL induziu uma maior atividade mitocondrial em macrófagos M2, aumentando de forma bastante significativa a capacidade respiratória destas células. Entretanto, em TAMs, o tratamento com ATL não foi capaz de alterar as taxas de consumo de oxigênio. Isso sugere que o ATL não possui efeito sobre o metabolismo mitocondrial dos TAMs, entretanto, o N amostral deste dado precisa ser aumentado e melhor analisado em futuros experimentos.

Figura 20 - O tratamento com ATL não altera o metabolismo oxidativo dos TAMs



Legenda: Macrófagos (2,5 x 10^5) M1, M2 ou TAMs, tratados ou não com ATL (10 nM), foram plaqueados em placas de cultura XF-24 (Seahorse Bioscience) por 24 horas. Após este período, as células foram incubadas com RPMI sem vermelho de fenol por 1 hora e a taxa de consumo de oxigênio (OCR) foi avaliada no *Seahorse Flux Analyzer* XF-24 (Seahorse Bioscience) durante 100 minutos, realizando a injeção de oligomicina (1 µM) no 20° minuto, de FCCP (0,9 µM) no 40° minuto, e de um mix contendo rotenona + antimicina A (1 µM) no 80° minuto. O gráfico representa média ± desvio padrão de 3 experimentos realizados separadamente.

Nota: A OCR foi normalizada pela D.O referente à quantidade de células; oligomicina (Oligo), FCCP e rotenona + antimicina A (Rot/Ant).

Fonte: A autora, 2019.

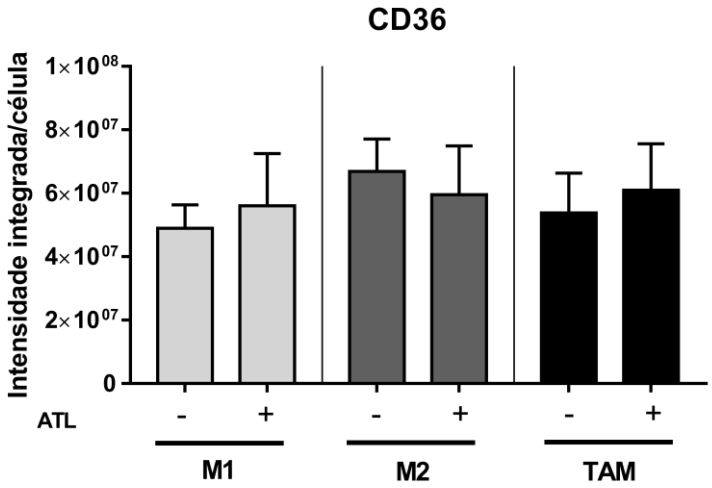
3.12 **O tratamento com ATL induz um aumento na captação de ácidos graxos**

Como observado anteriormente, diferente de macrófagos M2, os quais apresentam alta oxidação de ácidos graxos, TAMs apresentam baixa expressão de CD36 e consequente baixa captação de palmitato exógeno, sugerindo uma baixa atividade β-oxidativa nestas células. Diante disso, analisamos o efeito do ATL sobre a expressão proteica do CD36 e da captação de palmitato em TAMs e macrófagos M1 e M2.

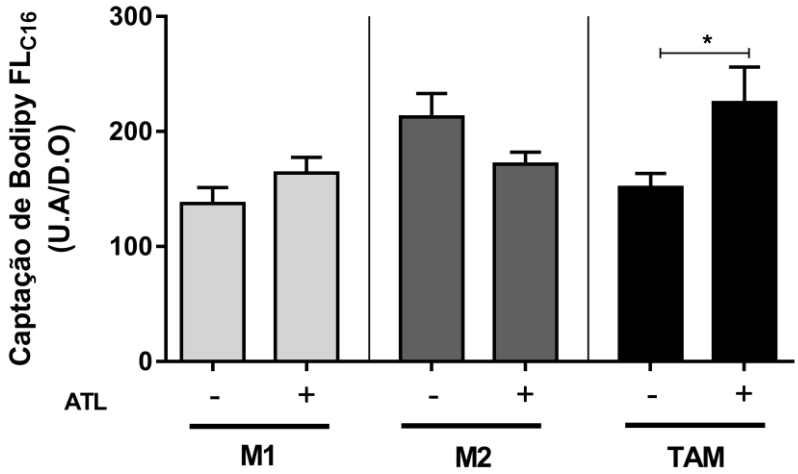
Na figura 21A observamos que o ATL não foi capaz de alterar a expressão de CD36 em nenhum subtipo de macrófago observado. Entretanto, o tratamento com ATL foi capaz de induzir uma maior captação de palmitato em TAMs, mas não em M1 ou M2 (figura 21B), sugerindo que o tratamento com este mediador inflamatório pode alterar o metabolismo oxidativo de ácidos graxos nestes macrófagos tumorais.

Figura 21 - O tratamento com ATL induz um aumento na captação de ácidos graxos

A



B



Legenda: Monócitos foram semeados em placas 96 poços preta (2 x 10^5) durante 7 dias para diferenciação em macrófagos. Após esse período, as células foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) + IFN -ɣ (100 ng/mL) (M1), IL-4 (40 ng/mL) (M2) e meio condicionado de MV3 (TAM) por 72 horas e tratadas com ATL (10 nM). Após 72h, as células foram marcadas com anti-CD36 conjugado à Alexa488 e analisadas através do leitor de placas confocal ImageXpress Ultra (Molecular Devices) e do software MetaXpress (Molecular Devices). (A) a quantificação proteica de CD36; Bodipy FL_{c16} (5 mM) foi adicionado à cultura de célula por 30 min, após este tempo, os poços foram lavados e a fluorescência referente ao Bodipy FL_{C16} absorvido pelas células (B) foi analisada através de leitor de placa (Envision-Perkin-Elmer®) e normalizada pela D.O referente à quantidade de células.

Nota: A quantificação (A) é referente à 4 campos adquiridos por poço de cada grupo em duplicata; *, $p \leq 0,05$.

Fonte: A autora, 2019.

3.13 **A inibição da via glicolítica não interfere no efeito do ATL sobre os TAMs**

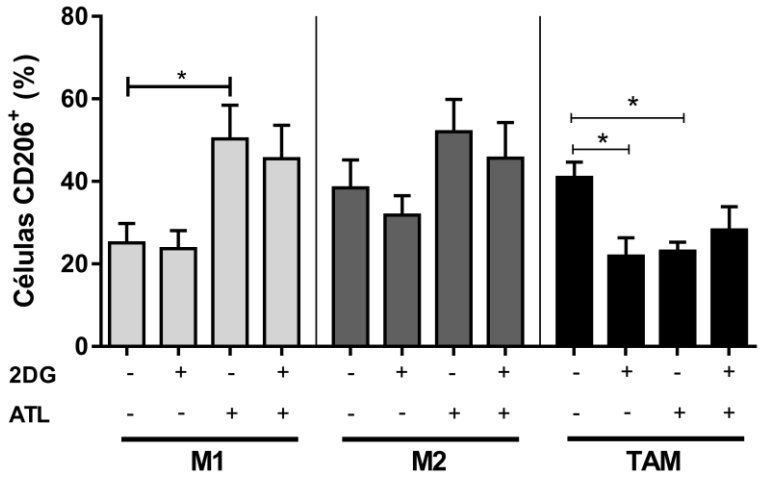
Como observado anteriormente, assim como macrófagos M1, TAMs apresentam intenso fluxo glicolítico, sendo esta via de extrema importância para a manutenção do perfil de marcadores presente nestas células. Com o objetivo de analisar a importância desta via no efeito disparado pelo ATL, macrófagos M1, M2 e TAMs, foram tratados com ATL e 2-DG por 72h, e a porcentagem de células positivas para marcadores M2, como CD206 e CD301, e marcador M1, como CD86, foi analisada por citometria de fluxo.

Corroborando dados anteriores do nosso grupo (Simões e col., 2017), observamos que o tratamento com ATL não possuiu efeito sobre o perfil de marcadores de macrófagos M2. No entanto, o tratamento com ATL foi capaz de aumentar a porcentagem de células $CD206^+$ (figura 22A), e diminuir a porcentagem de células $CD86^+$ (figura 22C), em macrófagos M1. Além disso, a inibição da via glicolítica não interferiu no efeito do ATL sobre o perfil de marcadores em macrófagos M1 (figuras 22A, 22B e 22C).

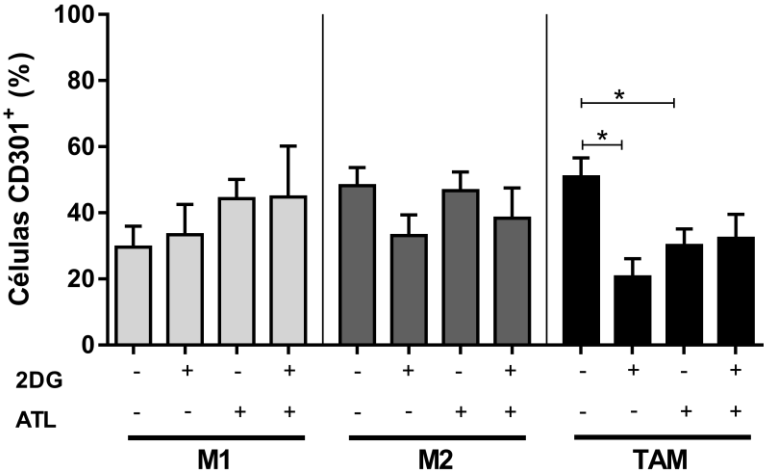
Corroborando dados anteriores do nosso grupo, observamos também, que o ATL foi capaz de induzir um *switch* do perfil M2-*like* dos TAMs em direção a um perfil M1-*like*, diminuindo a porcentagem de células $CD206^+$ (figura 22A) e $CD301^+$ (figura 22B). Entretanto, assim como observado em macrófagos M1, a inibição da via glicolítica não interferiu na diminuição de marcadores M2, induzida pelo ATL, em TAMs. Este conjunto de dados sugere que o efeito disparado pelo ATL sobre o perfil de marcadores em TAMs é similar ao disparado pela inibição da via glicolítica em TAMs.

Figura 22 - A inibição da via glicolítica não interfere no efeito do ATL sobre os TAMs

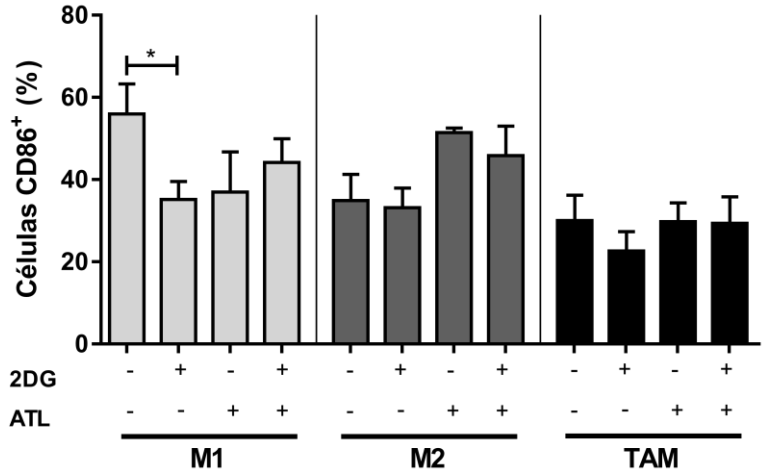
A



B



C



Legenda: Monócitos (2 x 10^5 células/poço) foram cultivados em placas de 96 poços durante 7 dias para diferenciação em macrófagos. Após esse período, as células foram estimuladas com

LPS (1 µg/mL) + IFN -ɣ (100 ng/mL) (M1), IL-4 (40 ng/mL) (M2) e meio condicionado de MV3 (TAM) por 72 horas e tratadas ou não com ATL (10 nM) e/ou 2-DG (1 mM). Após 72h, as células foram analisadas através de citometria de fluxo utilizando anti-CD206-PE (A), anti-CD301-PE (B) e anti-CD86-APC (C). Os gráficos representam média ± desvio padrão de 4 experimentos realizados separadamente.

Nota: *, $p \leq 0,05$.

Fonte: A autora, 2019.

3.14 O efeito do ATL sobre os TAMs é dependente da ativação da via das pentoses fosfato

Como foi visto anteriormente, a inibição da via das pentoses com 6-AN não altera o perfil fenotípico e funcional dos TAMs, sugerindo que assim como macrófagos M2, essas células não dependem do fluxo pela via das pentoses para manter seu perfil de marcadores, apenas os macrófagos M1 são dependentes da ativação da via das pentoses.

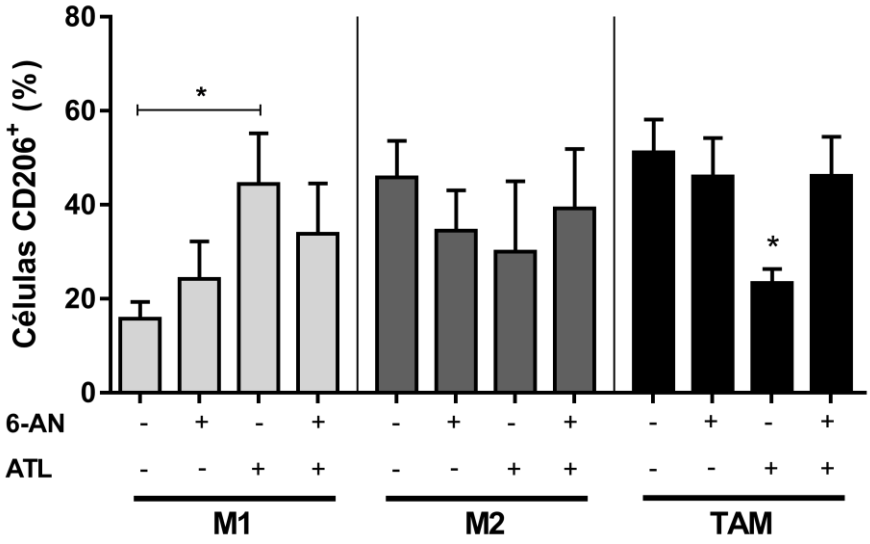
A fim de analisar o efeito do ATL sobre a via das pentoses, os macrófagos foram pré-tratados com 6-AN seguido pelo tratamento com a lipoxina. Após isso, os perfis fenotípico e funcional foram analisados, investigando a porcentagem de células positivas para CD206 (figura 23A) e CD301 (figura 23B), bem como a produção de ROS (figura 23C) e NO (figura 23D).

Observamos que o ATL foi capaz de induzir um aumento na porcentagem de células $CD206^+$ (figura 23A), bem como uma diminuição na produção de ROS (figura 23C) e NO (figura 23D), em macrófagos M1. Entretanto, a inibição da via das pentoses não inteferiu neste efeito do ATL em macrófagos M1, visto que o tratamento com 6-AN foi capaz de disparar as mesmas alterações nestas células. Em contraste, em macrófagos M2, o ATL não possuiu efeito sobre o perfil de marcadores fenotípicos e funcionais, o mesmo ocorreu ao inibir a via das pentoses.

Além disso, em TAMs, o tratamento com ATL diminuiu a porcentagem de células $CD206^+$ (figura 23A) e $CD301^+$ (figura 23B), ambos marcadores M2, e foi capaz de restaurar propriedades citotóxicas, induzindo a produção de ROS (figura 23C) e NO (figura 23D). De forma interessante, este efeito do ATL, sobre o perfil fenotípico e funcional dos TAMs, é revertido pelo tratamento com 6-AN (figuras 23A, 23B, 23C e 23D). Estes dados sugerem que o efeito disparado pelo ATL sobre os TAMs é dependente da via das pentoses.

Figura 23 - O efeito do ATL sobre os TAMs é dependente da ativação da via das pentoses fosfato (continua)

A



B

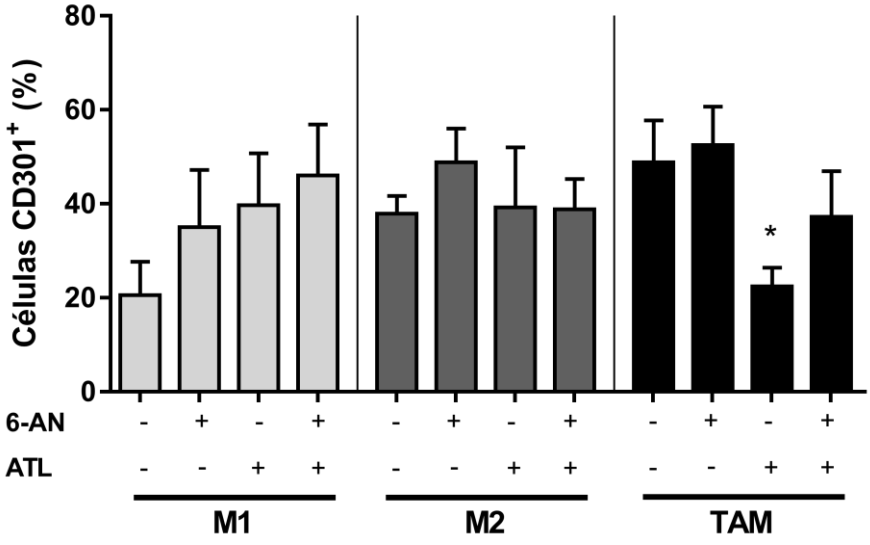
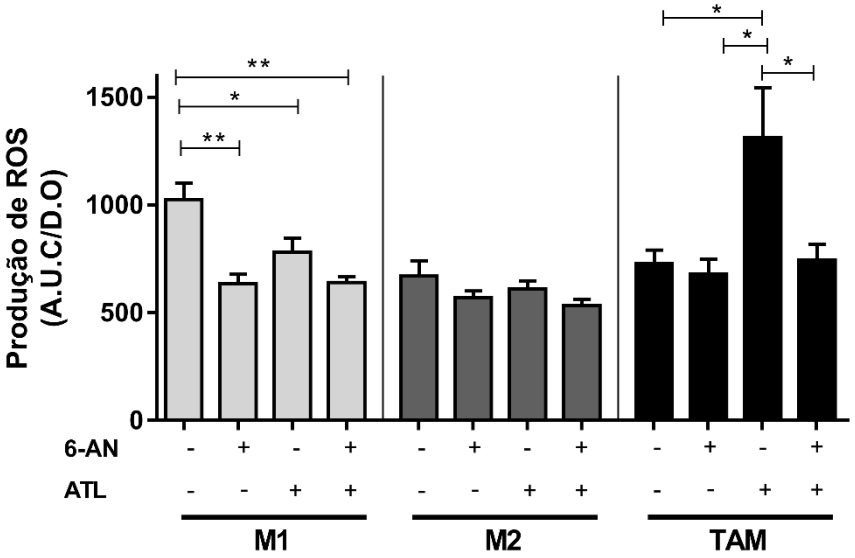
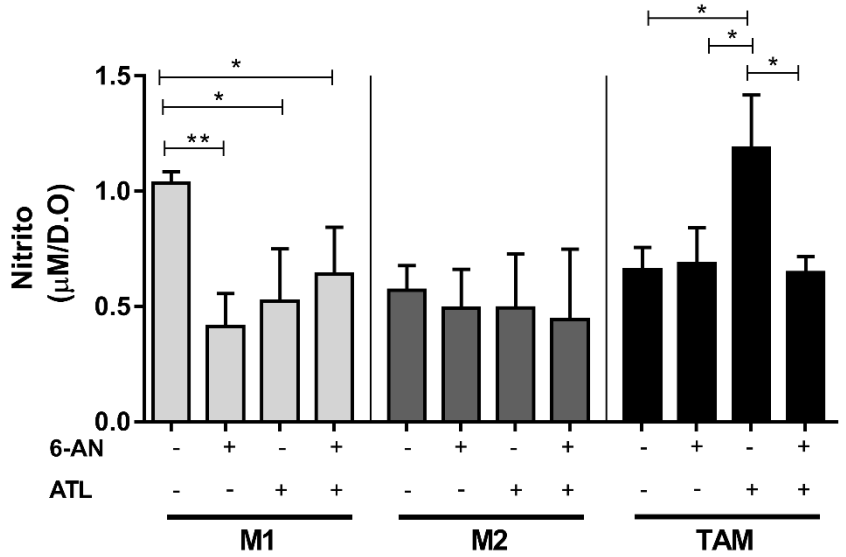


Figura 23 - O efeito do ATL sobre os TAMs é dependente da ativação da via das pentoses fosfato (conclusão)

C



D



Legenda: Monócitos (2 x 10^5 células/poço) foram cultivados em placas de 96 poços durante 7 dias para diferenciação em macrófagos. Após esse período, as células foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) + IFN -ɣ (100 ng/mL) (M1), IL-4 (40 ng/mL) (M2) e meio condicionado de MV3 (TAM) por 72 horas e pré-tratadas ou não com 6-AN (200 µm) por 30 minutos. Posteriormente, as células foram tratadas ou não com ATL (10 nM). Após 72 horas, as células foram analisadas através de citometria de fluxo utilizando anti-CD206-PE (A) e anti-CD301-PE (B); ou marcadas com luminol (50 µM) para análise da produção de ROS (C); o sobrenadante das células foi coletado para dosagem de nitrito por reação de Griess (D). Os gráficos representam média ± desvio padrão de 4 experimentos realizados separadamente.

Nota: (C) e (D) normalizados pela D.O referente à quantidade de células *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$.

Fonte: A autora, 2019.

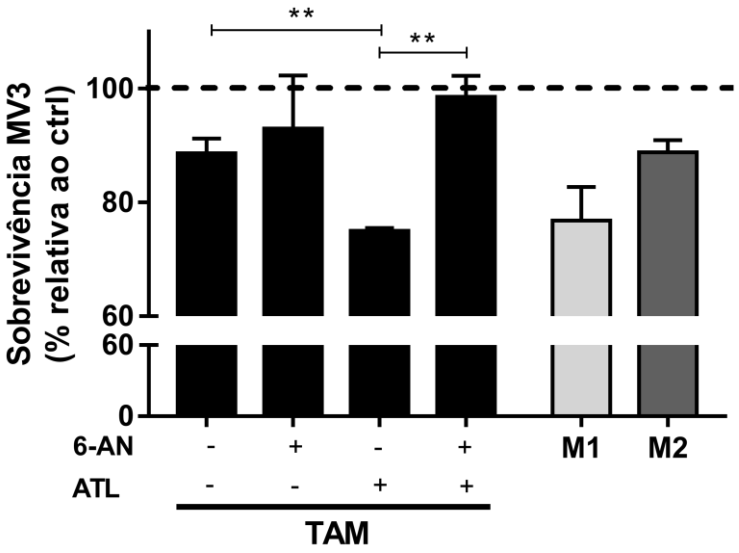
3.15 A ativação da via das pentoses induzida pelo ATL em TAMs é capaz de restaurar suas propriedades citotóxicas e levar a morte de células tumorais

Como observamos no resultado anterior, a restauração de propriedades citotóxicas, como a produção de ROS e NO, induzida pelo tratamento com ATL em TAMs, é dependente da ativação da via as pentoses fosfato. Esta é uma das principais vias que geram NADPH, importante cofator pra produção de NO pela iNOS e ROS pela NADPH oxidase.

Em dados anteriores do nosso grupo (Simões e col., 2017), foi observado que a indução da produção de ROS e NO pelos TAMs, disparada pelo tratamento com ATL, levam à indução de apoptose em células tumorais MV3. Desta forma, analisamos a importância da via das pentoses neste efeito citotóxico, disparado pelo tratamento com ATL em TAMs.

Na figura 24, corroborando dados anteriores, observamos que a sobrevivência de células tumorais MV3 foi diminuída, quando co-cultivadas por 24 horas com TAMs tratados com ATL, em relação às células MV3 co-cultivadas com TAMs não tratados com ATL. Entretanto, a diminuição da sobrevivência de células tumorais MV3, induzida pela co-cultura com TAMs tratados com ATL, foi inibida quando co-cultivada com TAMs tratados com ATL e 6-AN. Esse dado sugere que a inibição da via das pentoses, em TAMs, impede a restauração das propriedades citotóxicas induzida pelo ATL, impedindo a indução da morte das células tumorais.

Figura 24 - A ativação da via das pentoses induzida pelo ATL em TAMs é capaz de restaurar suas propriedades citotóxicas e levar a morte de células tumorais



Legenda: Monócitos (5 x 10^4 células/poço) foram semeados em placas de 96 poços durante 7 dias para diferenciação em macrófagos. Após esse período, as células foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) + IFN -ɣ (100 ng/mL) (M1), IL-4 (40 ng/mL) (M2) e meio condicionado de MV3 (TAM) por 72 horas e pré-tratadas ou não com 6-AN (200 µM) por 30 minutos. Posteriormente, as células foram tratadas ou não com ATL (10 nM). Após 72 horas, os poços foram lavados com meio RPMI para retirada do ATL e do inibidor, e foram posteriormente co-cultivados com células MV3 (2:1) marcadas com CMFDA. Após 24 horas, os poços foram lavados para retirada de células mortas e a porcentagem de sobrevivência da MV3 foi calculada através da fluorescência de CMFDA obtida por leitor de placa (Envision – Perkin-Elmer). O gráfico representa média ± desvio padrão de 3 experimentos realizados separadamente.

Nota: A linha tracejada corresponde a células MV3 cultivadas na ausência de macrófagos; **, $p \leq 0,01$.

Fonte: A autora, 2019.

3.16 A restauração da citotoxidade induzida pelo ATL nos TAMs é independente da quebra do citrato citosólico

Em um estudo recente, Liu e colaboradores demonstraram que a estimulação de macrófagos associados ao tumor com CpG é capaz de estimular a atividade antitumoral dessas células (Liu e cols, 2019). Esse efeito é bastante semelhante ao efeito da lipoxina, recentemente descrito pelo nosso grupo (Simões e col., 2017). O efeito do CpG reportado por Liu e colaboradores depende de um *switch* metabólico envolvendo a ativação da enzima ATP-citrato liase (ACLY) (Liu e col., 2019). Nesse sentido, decidimos analisar a participação da ACLY nos efeitos da lipoxina sobre TAMs.

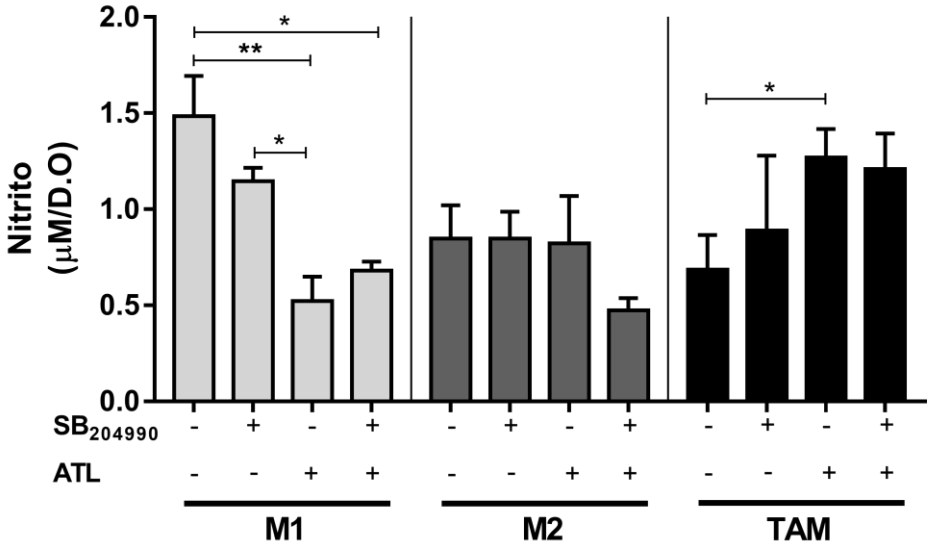
Além disso, em macrófagos M1, as principais fontes de NADPH são: a parte oxidativa da via das pentoses, e a conversão citosólica de malato em piruvato, pela enzima málica. A ACLY possui um importante papel nesta via, visto que é a responsável por converter o citrato citosólico em oxalacetato e Acetil-CoA. Posteriormente, o oxalacetato é convertido em malato (Willians & O'Neill, 2018). Como descrito anteriormente, o NADPH é importante para a produção de ROS e NO nestes macrófagos.

Diante disso, para analisar a participação desta via na produção de NO e posterior citotoxidade dos TAMs contra células tumorais, utilizamos o inibidor da ATP-citrato liase (ACLY), o SB204990. Observamos, na figura 25A, que a inibição desta enzima não foi capaz de alterar a produção de NO induzida pelo ATL em TAMs, sugerindo que o NO produzido em resposta ao tratamento com ATL, é dependente apenas do NADPH proveniente da via das pentoses fosfato.

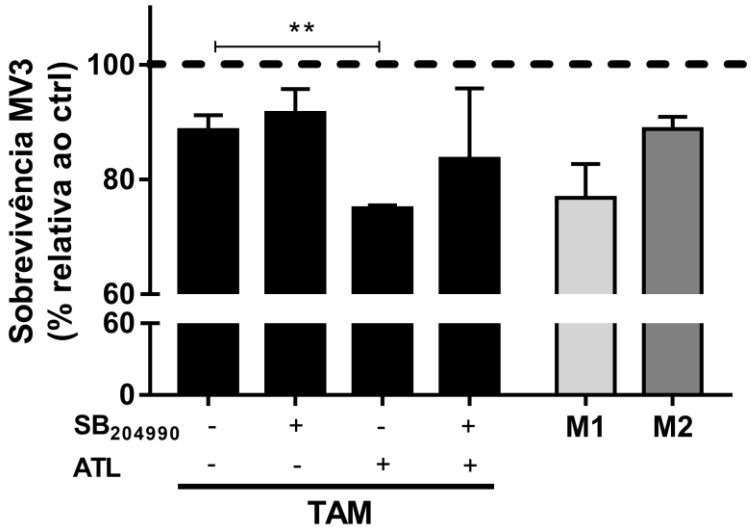
Corroborando este dado, observamos que a sobrevivência de células tumorais MV3 foi diminuída, em relação ao controle (MV3 cultivada sozinha), quando co-cultivadas por 24 horas com TAMs tratados com ATL, entretanto, o tratamento dos TAMs com ATL e o inibidor da ACLY, não foi capaz de alterar significativamente a sobrevivência de células tumorais MV3 (figura 25B). Em conjunto, estes dados sugerem que apenas a via das pentoses é responsável pela restauração de propriedades antitumorais, induzida pelo ATL, em TAMs.

Figura 25 – A restauração da citotoxidade induzida pelo ATL nos TAMs é independente da quebra do citrato citosólico

A



B



Legenda: Monócitos (5 x 10^4 células/poço) foram semeados em placas de 96 poços durante 7 dias para diferenciação em macrófagos. Após esse período, as células foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) + IFN -ɣ (100 ng/mL) (M1), IL-4 (40 ng/mL) (M2) e meio condicionado de MV3 (TAM) por 72 horas e pré-tratadas ou não com SB204990 (5 µM) por 30 minutos. Posteriormente, as células foram tratadas ou não com ATL (10 nM). Após 72 horas, os poços foram lavados com meio RPMI para retirada do ATL e do inibidor, e foram posteriormente co-cultivados com células MV3 (2:1) marcadas com CMFDA. Após 24 horas, os poços foram lavados para retirada de células mortas e a porcentagem de sobrevivência da MV3 foi calculada através da fluorescência de CMFDA obtida por leitor de placa (Envision – Perkin-Elmer). O gráfico representa média ± desvio padrão de 3 experimentos realizados separadamente.

Nota: (A) foi normalizado pela D.O referente à quantidade de célula; (B) a linha tracejada corresponde a células MV3 cultivadas na ausência de macrófagos; * $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$.

Fonte: A autora, 2019.

4. DISCUSSÃO

Está bem descrito que os diferentes fenótipos de macrófagos apresentam perfis metabólicos distintos que correspondem claramente ao reflexo de suas ações. Como exemplo, os macrófagos M1 desempenham um importante papel na primeira linha de defesa contra infecções bacterianas e são conhecidos por obter energia através da glicólise. Em contraste, macrófagos M2 estão envolvidos na reparação tecidual e na cicatrização, e utilizam o metabolismo oxidativo para abastecer suas funções a longo prazo (Galván-Peña & O'Neill, 2015).

Macrófagos presentes no microambiente tumoral (TAMs) são originados de monócitos inflamatórios, que adquirem características de macrófagos M2 quando atingem o microambiente tumoral (Bingle e col., 2002). Evidências mostram que os TAMs compartilham características tanto com macrófagos M1 quanto com M2, o que pode refletir alguns aspectos específicos do tipo de tumor e sua evolução, bem como sua localização no tecido tumoral.

Diante disso, neste estudo, tivemos como um dos objetivos principais elucidar as vias e requerimentos metabólicos ativos nos TAMs. Neste trabalho, observamos que os TAMs, apesar de apresentarem características fenotípicas semelhantes aos macrófagos M2, são metabolicamente distintos dessas células, apresentando um perfil metabólico mais glicolítico de maneira semelhante aos macrófagos M1. Nossos dados mostram que os TAMs aumentam a expressão e translocação de GLUT-1 para a membrana celular, seguido por alta expressão gênica de HK-2, alta captação de glicose, maior fermentação láctica e ativação de vias associadas a estas alterações metabólicas, como a via mTOR / Akt, importantes para manter o fluxo glicolítico. Estes resultados corroboram relatos anteriores mostrando que tanto os TAMs, derivados de uma co-cultura com células de carcinoma de tireoide não medular (Arts e col., 2016) e derivados do estímulo com meio condicionado de células de adenocarcinoma pancreático (Penny, e col., 2016), quanto os macrófagos M1 (LPS + IFN-γ) (Palsson-McDermott e col., 2015; Rodríguez-Prados e col., 2010; Van den Bossche, 2017) são altamente glicolíticos, enquanto macrófagos M2 (IL-4) são menos glicolíticos e mais oxidativos (Van den Bossche, 2017; Haschemi e col., 2015).

Curiosamente, nossos resultados mostram que TAMs também apresentam uma alta fosforilação oxidativa, sendo capazes de produzir grandes quantidades de ATP, importantes para manter suas funções pró-tumorais no microambiente tumoral. Este dado contrasta com o descrito por Penny e colaboradores em 2016, onde os TAMs derivados do estímulo com meio condicionado de células de adenocarcinoma pancreático apresentaram baixa capacidade respiratória, sugerindo uma diferença metabólica entre os macrófagos derivados de diferentes tumores.

Parte da glicose consumida pelos TAMs é usada para produzir lactato, que pode ser secretado ou oxidado a piruvato e depois acetil-CoA (A-CoA), direcionado ao ciclo de *Krebs* para abastecer a fosforilação oxidativa e utilizado diretamente como combustível. Diante disso, sugerimos que os substratos para a fosforilação oxidativa venham preferencialmente da oxidação de glicose, já que nossos dados demonstram que TAMs apresentam baixa expressão de CD36 e baixa captação de ácidos graxos, sugerindo que a FAO está diminuída nos TAMs. No entanto, esse comportamento metabólico provavelmente ocorre porque os TAMs estavam cultivados em um ambiente com concentrações normais de oxigênio. Sob condições de hipóxia, a proteína REDD1 (“regulada no desenvolvimento e na resposta ao dano no DNA 1”) é induzida, inibindo a atividade do mTOR e levando a uma redução na captação de glicose. Isto resultará em uma maior disponibilidade de glicose para as células endoteliais vizinhas, que, quando glicolíticas, apresentam um fenótipo hiperativo (Wenes e col., 2016).

Em 1927, Otto Warburg descreveu que as células tumorais dependem metabolicamente do aumento da glicólise, seguida pela sua fermentação em ácido lático. Esses processos ocorrem mesmo em condições de normóxia com disponibilidade de oxigênio, um processo chamado de glicólise aeróbica. Durante a carcinogênese, a reprogramação metabólica das células tumorais modifica os fluxos metabólicos, alterando assim, o ciclo de *Krebs* e aumentando a glicólise. Nas células tumorais, este fluxo de carbono glicolítico aumentado leva à produção de grandes quantidades de ácido lático (Romero-Garcia e col., 2016). As células tumorais produzem e secretam até 40 vezes mais ácido lático para microambiente extracelular do que as células normais, o que leva à redução do pH extracelular para 6,0-6,5 (Xie e col., 2014). Diversos estudos demonstram que a acidose leva à perda da função de linfócitos T infiltrantes em tumores humanos e murinos, o que pode ser restaurado tamponando o pH a valores fisiológicos (Choi e col., 2013). A acidose

lática é capaz de induzir também a produção de metaloproteinase-9 (MMP-9) em melanoma murino (Kato, e col., 1992) e expressão de IL-8 em adenocarcinoma pancreático (Shi, e col., 2000) e células de carcinoma do ovário (Xu e col., 2000). Além disso, o lactato é capaz de estimular diretamente a angiogênese, através da produção de VEGF-A em células de glioma e glioblastoma, e a ativação da via de sinalização do VEGF/VEGFR2 (Porporato e col., 2012). Adicionalmente, o lactato pode ainda, desencadear a fosforilação e degradação do IkBα em células endoteliais, estimulando a via NF-kB/IL-8, que impulsiona a migração celular e formação de túbulos, importante etapa da angiogênese e posterior metástase tumoral (Vegran, e col., 2011).

Além disso, o lactato é fundamental para o processo simbiótico entre células tumorais. Células que crescem sob condições hipóxicas aumentam o fluxo glicolítico e a produção de lactato, que é então secretado via MCT4 (do inglês *monocarboxylate transporter* 4). Enquanto as células tumorais que crescem sob condições aeróbicas, absorvem o lactato através do MCT1. Este lactato é então convertido em piruvato pela LDH-B, o piruvato é convertido à acetil-CoA, entra no ciclo de *Krebs* e seus produtos podem ser utilizados pela fosforilação oxidativa para a produção de energia (Romero-Garcia e col., 2016).

Nossos resultados sugerem que os TAMs podem também ser uma fonte de lactato dentro do microambiente tumoral. A hipótese do “Efeito Warburg Reverso” postula que o metabolismo glicolítico dos fibroblastos associados ao câncer (CAF) serve como uma fonte de lactato e piruvato abastecendo o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa das células tumorais, resultando na produção de ATP e aumento da capacidade proliferativa tumoral (Kato e col., 1992). Desta forma, assim como os CAFs, sugerimos que os TAMs podem aumentar a secreção de lactato com o mesmo propósito, acidificando o microambiente tumoral, induzindo sinais pró-angiogênicos e imunossupressores, além de servir como combustível para células tumorais, sustentando o poder pró-tumoral destes macrófagos e criando uma simbiose metabólica com as células tumorais.

Corroborando as características glicolíticas observadas em TAMs, observamos um aumento da fosforilação da Akt (S473), quando comparado aos macrófagos M2, e em concordância com este dado, observamos que este aumento é acompanhado de uma maior fosforilação e consequente ativação da mTOR. A mTOR é um importante sensor de nutriente/energia que acopla a

disponibilidade de nutrientes à regulação de processos metabólicos *downstream*, como a síntese proteica, glicólise e lipogênese (Howell & Manning, 2011). A mTOR, uma serina/treonina quinase, pertence a um complexo sensível a rapamicina chamado mTORC1 que é regulado negativamente pelo complexo TSC1/TSC2. Este complexo, uma vez silenciado, leva à ativação constitutiva da mTORC1 (Huang & Manning, 2009). Apesar dos poucos estudos sobre o papel do mTOR na regulação da ativação de macrófagos, é conhecido que macrófagos M1 apresentam uma hiperativação da mTORC1. A ativação da PI3K leva ao aumento da mTORC2, que, por sua vez, fosforila a Akt no resíduo S473, ativando e promovendo sua localização na membrana. A ativação de Akt leva a inibição do complexo TSC1/TSC2, promovendo a ativação da mTORC1 (Byles e col., 2013). Esta alta fosforilação da via Akt/mTOR observada nos TAMs, além de corroborar o alto fluxo glicolítico, pode sugerir também, uma maior ativação de proteínas relacionadas à síntese de ácidos graxos.

Apesar dos TAMs também apresentarem alta função mitocondrial, nossos dados indicam que a manutenção da expressão de marcadores M2 em TAMs é independente de oxigênio e, provavelmente, da fosforilação oxidativa, de maneira diferente do que ocorre em outros subtipos de macrófagos M2. A expressão dos marcadores M2 pelos TAMs parece depender realmente do aumento do fluxo glicolítico. Nossos dados corroboram relatos anteriores mostrando que os macrófagos M1 exercem o efeito *Warburg*, produzindo lactato independentemente do suprimento de oxigênio, enquanto M2 são mais oxidativos, utilizando glicólise para alimentar a cadeia respiratória e produzir lactato apenas na ausência de oxigênio. Além disso, os TAMs também realizam o efeito *Warburg*, secretando altas quantidades de lactato independente da presença de oxigênio. Está bem descrito que o lactato induz a polarização de TAMs, caracterizada pela expressão de marcadores do tipo M2 e pela indução da expressão de Vegf (Colegio e col., 2014; Mu e col., 2018). Desta forma, o lactato secretado pelos TAMs, além de acidificar o ambiente e servir de combustível para as células tumorais, como mencionado anteriormente, é importante para manter o perfil pró-tumoral dos macrófagos presentes nesse microambiente. A indução e manutenção desse perfil em TAMs ocorre nos estágios iniciais, com menor concentração de oxigênio, e nas fases posteriores, com maiores níveis de oxigênio. Dessa forma, sugerimos que o

lactato seja um efetor principal da modificação do perfil de TAMs, já que seus níveis não são alterados pela quantidade de oxigênio disponível.

Confirmando estes dados, observamos que a manutenção do perfil fenotípico dos TAMs depende da via glicolítica, como comprovado pela diminuição da porcentagem de células $CD206^+$ e $CD301^+$, após inibição desta via metabólica com 2-DG. Entretanto, o uso do 2-DG não altera a porcentagem de células $CD86^+$, um marcador M1, nos TAMs, sugerindo que a inibição do fluxo glicolítico em TAMs modifica o perfil M2-*like*. O inverso ocorre com macrófagos M1, onde a inibição da via glicolítica nessas células não altera a porcentagem de células $CD206^+$ nem $CD301^+$, mas diminui a de $CD86^+$. A diminuição da porcentagem de $CD206^+$ e $CD301^+$ em TAMs pode ser devido ao fato de que, na presença de 2-DG, a glicose não é metabolizada pela hexoquinase, levando à uma menor secreção de lactato no meio.

Além do lactato, foi descrito por Jha e colaboradores a importância de outras vias que dependem de glicose para a ativação M2. A produção de UDP-GlcNAC pela via biosintética das hexosaminas, depende de níveis intracelulares de glicose, glutamina, acetil-CoA e de UDP. Foi visto que a inibição da N-glicosilação, uma via que requer UDP-GlcNAC como doadora de açúcar, foi capaz de inibir a ativação M2 (medida pela expressão de Relmα, CD206 e CD301) (Jha e col., 2015). Isto pode refletir o requisito de N-glicosilação para o correto enovelamento e tráfego de proteínas, como Relmα, CD206 e CD301, que são destinadas à secreção ou exportação para a superfície celular. Desta forma, a diminuição da porcentagem de $CD206^+$ e $CD301^+$ observada em TAMs tratados com o inibidor da via glicolítica, pode ser devido também a uma menor disponibilidade de frutose-6-fosfato derivado da glicose, intermediário que alimenta a via das hexosaminas para a biossíntese de UDP-GlcNAc.

O aumento do metabolismo glicolítico em macrófagos M1 não só produz ATP como energia para sustentar suas funções secretoras e fagocíticas, mas também alimenta a via das pentoses fosfato (Van Den Bossche e col., 2017). A via das pentoses é uma ramificação da via glicolítica, pois utiliza a glicose-6-fosfato proveniente do início da glicólise. Juntas, estas vias suportam as respostas inflamatórias de macrófagos M1, gerando aminoácidos para síntese de proteínas, ribose para nucleotídeos além de NADPH para a produção de ROS pela NADPH oxidase e NO pela iNOS (Nagy & Haschemi, 2015). Ao inibir a via das pentoses dos

diferentes perfis de macrófagos, observamos que apenas os macrófagos M1 diminuem a porcentagem de células $CD86^+$ e a produção de ROS e NO, marcadores clássicos M1. Estes dados sugerem que, assim como os macrófagos M2, os TAMs, apesar de apresentarem um intenso fluxo glicolítico, não apresentam fluxo na via das pentoses, o que pode explicar a baixa produção de ROS e NO observada nessas células.

Além das quinases HK (hexoquinase) e PFK (fosfofrutoquinase), responsáveis por controlar a utilização da glicose de acordo com as exigências celulares, foi mais recentemente descrita a CARKL, uma sedoheptulase quinase, responsável pela conversão de sedoheptulase em sedoheptulase-7-fosfato (S7P), equilibrando os intermediários G3P e S7P da glicólise e da PPP não oxidativa, limitando desta forma a PPP (Haschemi e col., 2012). Haschemi e colaboradores, demonstraram que a PPP suprimida em macrófagos M2, era consequência da expressão de CARKL por essas células. Os autores demonstraram que a perda de CARKL simulava o aumento da taxa de acidificação extracelular (ECAR) e a diminuição na taxa de consumo de oxigênio (OCR) observada na estimulação com LPS, enquanto a superexpressão desta sedoheptulase quinase, atenuava o efeito do LPS sobre a ECAR e a OCR. Portanto, a regulação negativa de CARKL parece ser importante para o redirecionamento da glicose, do metabolismo aeróbio para a glicólise e a PPP, que é observada em macrófagos M1 (Haschemi e col., 2012). Entretanto, em TAMs a regulação dessa sedoheptulase quinase ainda não foi descrita. Com base nos resultados obtidos neste trabalho, onde observamos que os TAMs, assim como macrófagos M2, não apresentam um fluxo de carbono através da PPP, e esta via não parece possuir importância para a ativação do seu perfil, sugerimos que, nestes macrófagos tumorais, exista a regulação da PPP, porém não a mesma encontrada em macrófagos M1 e M2, como a CARKL, visto que os TAMs apresentam fluxo glicolítico e fosforilação oxidativa funcionando de maneira concomitante.

Além do aumento do fluxo glicolítico e atividade da via das pentoses, o ciclo de *Krebs* interrompido também é uma importante característica de macrófagos pró-inflamatórios M1 (O'Neill, 2016). A interrupção em duas etapas do ciclo de *Krebs* gera o acúmulo de succinato e citrato em macrófagos M1 (Michelucci e col., 2013; Tannahill e col., 2013). O citrato acumulado pode ser redirecionado a itaconato pela enzima codificada pelo gene imuno responsivo 1 (Irg1), que é capaz de inibir a SDH

(succinato desidrogenase), uma enzima que faz parte da cadeia de transporte de elétrons (CII), inibindo desta forma a fosforilação oxidativa (Tannahill e col., 2013). Além do citrato, o NO derivado da iNOS também é capaz de inibir a fosforilação oxidativa em macrófagos M1 (Jha e col., 2015). Entretanto, já é bem descrito que TAMs apresentam um aumento da atividade da arginase-1, enzima que compete pelo mesmo substrato que a iNOS, gerando níveis de NO muito mais baixos que macrófagos M1. Este fato poderia explicar o aumento da fosforilação oxidativa observada em TAMs mesmo com o aumento da via glicolítica, sugerindo que estes macrófagos tumorais apresentam características metabólicas semelhante aos macrófagos M1, mas diferem em alguns outros pontos do metabolismo, sendo necessário um estudo mais aprofundado de cada via metabólica.

A evidente relação entre células envolvidas na resposta inflamatória e o desenvolvimento tumoral sugere que mediadores com propriedades pró-resolutivas possam modular e controlar a progressão tumoral. Algumas vertentes apontam que tumores seriam respostas inflamatórias que nunca são resolvidas (Coussens & Werb, 2002). Dessa forma, a lipoxina (LXs), um importante mediador pró-resolutivo, constitui um potencial alvo para o tratamento do câncer. Em trabalhos anteriores, nosso grupo demonstrou que a lipoxina apresenta efeitos anti-inflamatórios e pró-resolutivos em monócitos e em células endoteliais (Simões e col., 2010 & Nascimento-Silva e col., 2005). Em células mononucleares, as LXs exibem atividades estimulatórias bastante específicas, inibindo a apoptose, além de estimular a migração e adesão, porém sem ativar características tóxicas (Maddox & Serhan, 1996, Simões e col., 2010). Dados mais recentes do nosso grupo mostram que o lipoxina A_4 induz a alteração fenotípica nos TAMs derivados de tumores humanos para um perfil M1-*like*, com alta atividade citotóxica, resultando na apoptose das células tumorais *in vivo* e *in vitro* (Simões e col., 2017).

Neste presente estudo, analisamos o efeito da 15-epi-LXA_4 no metabolismo dos TAMs. Confirmamos que, assim como em trabalhos anteriores do grupo, a lipoxina é capaz de diminuir a porcentagem de células positivas para marcadores M2, como CD206 e CD301, porém não altera a porcentagem de células $CD86^+$, um marcador M1 (Simões e col., 2017). Além disso, a inibição da via glicolítica também reduz a expressão de marcadores M2 em TAMs. Interessantemente, a inibição da via glicolítica não interfere no efeito da lipoxina sobre os TAMs. Dessa forma, demonstramos que a inibição desta via apresenta o mesmo efeito observado pelo

ATL sobre o perfil de marcadores dessas células. Além disso, observamos que o tratamento com lipoxina não altera o consumo de glicose, a expressão gênica de HK-2 e a secreção de lactato pelos TAMs, confirmando que a lipoxina não exerce seu efeito através da modulação da via glicolítica nos TAMs.

Wenes e colaboradores demonstraram que, em condições hipóxicas, os TAMs regulam positivamente a proteína REDD1, inibindo a glicólise através da downmodulação da mTOR, levando à um aumento da resposta angiogênica. Em contraste, os TAMs deficientes em REDD1 são capazes de competir com células endoteliais vizinhas pela glicose, através da ativação da mTOR, diminuindo a hiperativação dessas células e levando à normalização da estrutura vascular, e menos metástases (Wenes e col., 2016). Os dados deste grupo sugerem que o efeito favorável de medicamentos utilizados no tratamento de tumores malignos, como inibidores de mTOR, poderia ser dificultado por seus efeitos no metabolismo dos TAMs através de mudanças subsequentes em seu fenótipo funcional. Diante disso, o efeito da lipoxina sobre o perfil fenotípico e funcional dos TAMs sem indução de alterações no metabolismo glicolítico destas células, é um fato bastante interessante, e evidencia ainda mais o potencial terapêutico do ATL.

Em macrófagos M2, a oxidação de ácidos graxos (FAO) suporta o metabolismo oxidativo mitocondrial. O receptor *scavenger* CD36 desempenha um papel fundamental no fornecimento de lipoproteínas para os lisossomos, liberando ácidos graxos, os tornando disponíveis para β-oxidação na mitocôndria (Vats e col, 2006; Huang e col., 2014). Entretanto, apesar dos TAMs compartilharem algumas características metabólicas com macrófagos M2, como a alta função mitocondrial, estes tipos de macrófagos parecem diferir no uso de ácidos graxos exógenos. TAMs apresentam baixa captação de palmitato exógeno de maneira inversa ao encontrado em macrófagos M2. Em nossos resultados, a lipoxina não foi capaz de alterar a fosforilação oxidativa observada nos TAMs. No entanto, o tratamento com este mediador inflamatório levou a um aumento da captação de ácidos graxos nesses macrófagos tumorais. Dessa forma, sugerimos que o tratamento com a lipoxina pode alterar a fonte de utilização desses ácidos graxos pelos TAMs, inibindo a síntese de ácidos graxos que estaria abastecendo a FAO em um ciclo energeticamente fútil e induzindo a captação exógena de ácidos graxos. Dessa forma, a captação de ácidos graxos exógenos e sua β-oxidação mitocondrial serve como combustível para o

funcionamento do ciclo de *Krebs,* gerando NADH e $FADH_2$ para a fosforilação oxidativa.

Outra possível explicação para a manutenção do ciclo de *Krebs* após o tratamento com a lipoxina seria o redirecionamento do metabolismo da glutamina nestas células. Em TAMs, é possível que a maior parte da glutamina captada seja direcionada pela via das hexosaminas para produção de UDP-GlcNAc. Nesta via, a glicose-6-fosfato é convertida em frutose-6-fosfato, que não é utilizada pela PFK como na glicólise e, em vez disso, reage com a glutamina amino-doadora formando glucosamina-6-fosfato. O produto final desta via, a UDP-GlcNAc, tem um importante papel em modificações pós translacionais de proteínas relacionadas ao perfil M2 dos TAMs, como os receptores CD206 e CD301, como já mencionado anteriormente. Como observamos uma diminuição desses receptores na superfície celular de TAMs tratados com ATL, é possível que esta via seja inibida e, que a glutamina sirva então, como um refil anaplerótico do ciclo de *Krebs* nestas células.

Como mencionado anteriormente, macrófagos M1 apresentam um acúmulo de citrato, devido às quebras no ciclo de *Krebs* (O'Neill, 2015), e aumento da expressão gênica e proteica do CIC (carreador de citrato mitocondrial). Este carreador exporta o citrato da mitocôndria (Infantino e col., 2011). Uma vez no citosol, o citrato pode ser utilizado pela *de novo* lipogênese. Este processo envolve a participação da ACLY (ATP- citrato liase), que quebra o citrato citosólico em acetil-CoA e oxalacetato. Este, é convertido em malato pela malato desidrogenase, podendo retornar ao ciclo de *Krebs,* ou ser metabolizado em piruvato pela enzima málica em uma reação que gera NADPH. Este NADPH, assim como o gerado pela PPP, pode ser utilizado para a síntese de ROS e NO nesses macrófagos (Infantino e col., 2013). Em adição a isso, em um recente estudo, foi visto que a inibição da ATP-citrato liase (ACLY), foi capaz de anular a atividade fagocitária antitumoral de macrófagos estimulados com CpG, um composto capaz de ativar propriedades antitumorais em macrófagos (Liu e col., 2019). Entretanto, em nosso modelo, onde o ATL é capaz de induzir propriedades antitumorais e um perfil M1-*like* em TAMs, a inibição da ACLY, não pareceu alterar estes efeitos. Não sendo capaz de anular o efeito antitumoral, nem a produção de NO, disparado pela lipoxina em TAMs. Estes dados sugerem que o NO e ROS, induzidos pela lipoxina nessas células, não são dependentes do NADPH proveniente (de forma indireta) do citrato.

Entretanto, demonstramos no presente trabalho que a inibição da via das pentoses em TAMs anula o efeito antitumoral disparado pela lipoxina, impedindo a restauração da produção de ROS e NO. Além disso, a inibição da via das pentoses é capaz de afetar o *switch* fenotípico induzido pelo ATL em TAMs, impedindo a diminuição da porcentagem de marcadores M2, como CD206 e CD301. Acreditamos que a lipoxina age induzindo a via das pentoses em TAMs, redirecionando o fluxo de carbono da via das hexosaminas para a via das pentoses, diminuindo a expressão de marcadores M2 dependentes da N-glicosilação, a qual utiliza como substrato o UDP-GlcNAc gerado pela via das hexosaminas, e aumentando marcadores M1, dependentes da via das pentoses.

Corroborando esta ideia, nossos dados mostram um aumento da expressão da forma monomérica da PKM2, a forma menos enzimaticamente ativa desta piruvato quinase. Desta forma, sugerimos que a diminuição da atividade enzimática da PKM2 promove um aumento no fluxo de intermediários glicolíticos em direção à via das pentoses fosfato.

Além disso, em alguns tipos celulares, foi observado que o AMP cíclico (c-AMP) é capaz de regular negativamente a atividade de G6PDH, a primeira enzima da PPP. O c-AMP pode ativar a proteína quinase A (PKA), que fosforila diretamente a G6PDH nos resíduos de serina e treonina inibindo a atividade desta enzima (Leopold e col., 2007; Zhang e col., 2000). Em um outro estudo, foi observado que a exposição de macrófagos a lipoxina A_4 foi capaz de atenuar, de forma consistente, a ativação de PKA induzida pela adição de PGE2 (prostaglandina E2) exógena (Godson e col., 2000). Diante disso, podemos sugerir que: os TAMs podem apresentar um baixo fluxo através da PPP, devido a inibição da atividade da G6PDH pela PGE2, secretada em grandes quantidades pela maior parte dos tumores (Wang e col., 2010), através da ação da PKA; e a lipoxina pode atuar na restauração da PPP através da inibição da PKA.

De maneira geral, nossos dados sugerem que os TAMs possuem um aumento do fluxo glicolítico, que é de extrema importância para manter seu perfil de marcadores M2, porém, sem dependência da fosforilação oxidativa, como em outros tipos de macrófagos M2. Estes resultados corroboram a ideia de que os TAMs possuem características tanto M1 como M2. Sabe-se que os TAMs são originados de monócitos $LY6C^{high}$ inflamatórios (Cortez-Retamozo e col., 2012) e ao chegar ao microambiente tumoral adquirem características de macrófagos M2. Neste trabalho,

sugerimos que os TAMs adquirem o perfil funcional de macrófagos M2, porém mantem algumas características metabólicas relacionadas ao perfil M1.

Estas diferenças metabólicas encontradas nos diferentes subtipos de macrófagos, podem explicar a regulação seletiva da lipoxina em TAMs, observada pelo nosso grupo. As vias metabólicas diferentes podem justificar porque a lipoxina modifica o perfil de TAMs e não possui o mesmo efeito em macrófagos M2 (IL-4). Além disso, sugerimos que o ATL pode controlar a progressão tumoral através da modulação da via das pentoses, restaurando as características citotóxicas dos TAMs. Este trabalho demonstra pela primeira vez o papel da lipoxina na modulação de vias metabólicas, bem como sua conexão com efeitos antitumorais e seletivos em macrófagos. Em conjunto, nossos dados sugerem que a regulação metabólica pode constituir uma importante ferramenta na descoberta de novos alvos para o tratamento do câncer.

CONCLUSÃO

Neste trabalho, nós demonstramos que os macrófagos associados ao tumor (TAMs) compartilham características metabólicas tanto com macrófagos M1/M(LPS + IFN- γ): a) alto fluxo glicolítico; b) alta secreção de lactato; c) e baixa captação exógena de ácidos graxos, como M2/M(IL-4): d) alta função mitocondrial; e) baixo fluxo pela via das pentoses. Mostramos ainda, que o alto fluxo glicolítico presente nestas células, mas não a fosforilação oxidativa, é de extrema importância para manter o fenótipo de marcadores M2 em TAMs. Além disso, nossos resultados apontam que os efeitos da lipoxina no controle tumoral depende da restauração da via das pentoses em TAMs. Evidenciando, desta forma, a lipoxina como uma importante estratégia capaz de direcionar o metabolismo dos TAMs, de uma maneira seletiva e específica, e induzir propriedade antitumorais.

REFERÊNCIAS

Akram M. Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism. Cell Biochemistry and Biophysics. 2014;68(3):475-8.

Albina JE, Mastrofrancesco B. Modulation of glucose metabolism in macrophages by products of nitric oxide synthase. 1993; 264(6):C1594-C9.

Allen M, Louise Jones J. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. 2011;223(2):163-77.

Arsenault RJ, Kogut MH. Immunometabolism and the Kinome Peptide Array: A New Perspective and Tool for the Study of Gut Health. Frontiers in veterinary science. 2015; 2:44.

Arts RJW, Plantinga TS, Tuit S, Ulas T, Heinhuis B, Tesselaar M, e col. Transcriptional and metabolic reprogramming induce an inflammatory phenotype in non-medullary thyroid carcinoma-induced macrophages. Oncoimmunology. 2016; 5(12): e1229725-e.

Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. Dermatology research and practice. 2010; 2010:583748.

Bhatelia K, Singh K, Singh RJCs. TLRs: linking inflammation and breast cancer. Cellular signalling. 2014;26(11):2350-7.

Billings EA, Lee CS, Owen KA, D'Souza RS, Ravichandran KS, Casanova JEJSS. The adhesion GPCR BAI1 mediates macrophage ROS production and microbicidal activity against Gram-negative bacteria. Sci. Signal. 2016;9(413):ra14-ra.

Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. 2002;196(3):254-65.

Bonavita E, Galdiero MR, Jaillon S, Mantovani A. Phagocytes as corrupted policemen in cancer-related inflammation. Advances in cancer research. 2015. p. 141-71.

Börgeson E, Johnson AM, Lee YS, Till A, Syed GH, Ali-Shah ST, e col. Lipoxin A4 attenuates obesity-induced adipose inflammation and associated liver and kidney disease. Cell metabolismo. 2015; 22(1):125-37.

Boroughs LK, DeBerardinis RJ. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. Nature cell biology. 2015;17(4):351-9.

Byles V, Covarrubias AJ, Ben-Sahra I, Lamming DW, Sabatini DM, Manning BD, e col. The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. Nature communications. 2013; 4:2834-.

Cader MZ, Boroviak K, Zhang Q, Assadi G, Kempster SL, Sewell GW, e col. C13orf31 (FAMIN) is a central regulator of immunometabolic function. Nature Immunology. 2016; 17:1046.

Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. Nature Reviews Cancer. 2011; 11:85.

Cairns RA, Mak TW. The current state of cancer metabolism. Nature Reviews Cancer. 2016; 16:613.

Canny G, Levy O, Furuta GT, Narravula-Alipati S, Sisson RB, Serhan CN, e col. Lipid mediator-induced expression of bactericidal/ permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002; 99(6):3902-7.

Cantor JR, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. Cancer Discov. 2012; 2(10):881-98.

Caronni N, Savino B, Bonecchi RJI. Myeloid cells in cancer-related inflammation. 2015; 220(2):249-53.

Cezar-de-Mello PF, Vieira AM, Nascimento-Silva V, Villela CG, Barja-Fidalgo C, Fierro IM. col. ATL- 1, an analogue of aspirin- triggered lipoxin A4, is a potent inhibitor of several steps in angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. British journal of pharmacology. 2008; v. 153, n. 5, p. 956-965.

Chandrasekharan JA, Sharma-Walia N. Lipoxins: nature's way to resolve inflammation. J Inflamm Res. 2015; 8:181-92.

Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. Cancers (Basel). 2014; 62014. p. 1670-90.

Chen M, David CJ, Manley, JL. Concentration-dependent control of pyruvate kinase M mutually exclusive splicing by hnRNP proteins. Nature structural & molecular biology. 2012; v. 19, n. 3, p. 346.

Chen Y, Hao H, He S, Cai L, Li Y, Hu S, e col. Lipoxin A4 and its analogue suppress the tumor growth of transplanted H22 in mice: the role of antiangiogenesis. Mol Cancer Ther. 2010;9(8):2164-74.

Chiang N, Serhan CN, Dahlen SE, Drazen JM, Hay DW, Rovati GE, e col. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. Pharmacol Rev. 2006; 58(3):463-87.

Chiang N, Takano T, Arita M, Watanabe S, Serhan CN. A novel rat lipoxin A4 receptor that is conserved in structure and function. Br J Pharmacol. 2003; v.139, n.1, May, p.89-98.

Chiang N, Serhan CN, Dahlén SE, Drazen JM, Hay DW, Rovati GE, e col. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. Pharmacological reviews. 2006; v. 58, n. 3, p. 463-487.

Choi J, Stradmann-Bellinghausen B, Yakubov E, Savaskan NE, Régnier-Vigouroux A. Glioblastoma cells induce differential glutamatergic gene expressions in human tumor-associated microglia/macrophages and monocyte-derived macrophages. Cancer biology & therapy. 2015; v. 16, n. 8, p. 1205-1213.

Chovatiya R, Medzhitov R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. Mol Cell. 2014;54(2):281-8.

Civetta MT, Civetta JD. Carcinogénesis. Salud Publica. 2011; Mex.53:405-414.

Claria J, Serhan CN. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92(21):9475-9.

Clish CB, Levy BD, Chiang N, Tai HH, Serhan CN. Oxidoreductases in lipoxin A4 metabolic inactivation: a novel role for 15-onoprostaglandin 13-reductase/leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase in inflammation. J Biol Chem. 2000;275(33):25372-80.

Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, e col. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. Nature. 2014;513(7519):559-63.

Cortez-Retamozo V, Etzrodt M, Newton A, Rauch PJ, Chudnovskiy A, Berger C, e col. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(7):2491-6.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. Nature. 2002;420(6917):860-7.

Covarrubias AJ, Aksoylar HI, Horng T. Control of macrophage metabolism and activation by mTOR and Akt signaling. Semin Immunol. 2015;27(4):286-96.

De Monte L, Wormann S, Brunetto E, Heltai S, Magliacane G, Reni M, e col. Basophil Recruitment into Tumor-Draining Lymph Nodes Correlates with Th2 Inflammation and Reduced Survival in Pancreatic Cancer Patients. Cancer Res. 2016;76(7):1792-803.

DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. Sci Adv. 2016;2(5):e1600200.

Deng T, Lyon CJ, Bergin S, Caligiuri MA, Hsueh WA. Obesity, Inflammation, and Cancer. Annu Rev Pathol. 2016; 11:421-49.

Diakos CI, Charles KA, McMillan DC, Clarke SJ. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. Lancet Oncol. 2014;15(11):e493-503.

Dinapoli MR, Calderon CL, Lopez DM. The altered tumoricidal capacity of macrophages isolated from tumor-bearing mice is related to reduce expression of the inducible nitric oxide synthase gene. Journal of Experimental Medicine. 1996; v. 183, n. 4, p. 1323-1329.

Dmitrieva OS, Shilovskiy IP, Khaitov MR, Grivennikov SI. Interleukins 1 and 6 as Main Mediators of Inflammation and Cancer. Biochemistry (Mosc). 2016;81(2):80-90.

Everts B, Amiel E, Huang SC, Smith AM, Chang CH, Lam WY, e col. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKKvarepsilon supports the anabolic demands of dendritic cell activation. Nat Immunol. 2014;15(4):323-32.

Fan J, Kamphorst JJ, Mathew R, Chung MK, White E, Shlomi T, e col. Glutamine-driven oxidative phosphorylation is a major ATP source in transformed mammalian cells in both normoxia and hypoxia. Mol Syst Biol. 2013; 9:712.

Festuccia WT, Pouliot P, Bakan I, Sabatini DM, Laplante M. Myeloid-Specific Rictor Deletion Induces M1 Macrophage Polarization and Potentiates In Vivo Pro-Inflammatory Response to Lipopolysaccharide. PLoS One. 92014.

Fiore S, Maddox JF, Perez HD, Serhan CN. Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor. J Exp Med. 1994;180(1):253-60.

Galván-Peña S, O'Neill LAJ. Metabolic Reprograming in Macrophage Polarization. Front Immunol. 2014;5.

Ganeshan K, Chawla A. Metabolic regulation of immune responses. Annu Rev Immunol. 2014; 32:609-34.

Godson C, Mitchell S, Harvey K, Petasis NA, Hogg N, Brady HR. Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. J Immunol. 2000;164(4):1663-7.

Gon AS, Minelli L, Guembarovski AL. Melanoma cutâneo primário em Londrina. An. bras. Dermatol. 2001; v. 76, n. 4, p. 413-426.

Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, Skeen JE, Sonenberg N, Hay N. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. J Biol Chem. 2005;280(37):32081-9.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100(1):57-70.

Hao NB, Lu MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. Clin Dev Immunol. 2012; 2012:948098.

Haschemi A, Kosma P, Gille L, Evans CR, Burant CF, Starkl P, e col. The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. Cell Metab. 2012;15(6):813-26.

Heller DS, Hameed M, Cracchiolo B, Wiederkehr M, Scott D, Skurnick J, e col. Presence and quantification of macrophages in squamous cell carcinoma of the cervix. Int J Gynecol Cancer. 2003;13(1):67-70.

Hensley CT, Wasti AT, DeBerardinis RJ. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. J Clin Invest. 2013; 1232013. p. 3678-84.

Hitosugi T, Kang S, Vander Heiden MG, Chung TW, Elf S, Lythgoe K, e col. Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth. Sci Signal. 2009;2(97):ra73.

Howell JJ, Manning BD. mTOR couples cellular nutrient sensing to organismal metabolic homeostasis. Trends Endocrinol Metab. 2011;22(3):94-102.
Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. Cell. 2008;134(5):703-7.

Huang J, Manning BD. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. Biochem Soc Trans. 2009;37(Pt 1):217-22.

Huang SC, Everts B, Ivanova Y, O'Sullivan D, Nascimento M, Smith AM, e col. Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. Nat Immunol. 2014;15(9):846-55.

Infantino V, Convertini P, Cucci L, Panaro MA, Di Noia MA, Calvello R, e col. The mitochondrial citrate carrier: a new player in inflammation. Biochem J. 2011;438(3):433-6.

Infantino V, Iacobazzi V, Palmieri F, Menga A. ATP-citrate lyase is essential for macrophage inflammatory response. Biochem Biophys Res Commun. 2013;440(1):105-11.

Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2018 [Internet]. Rio de Janeiro; 2018 [acesso em 2019 fevereiro]. Disponível em: www1.inca.gov.br

Israelsen WJ, Dayton TL, Davidson SM, Fiske BP, Hosios AM, Bellinger G, e col. PKM2 isoform-specific deletion reveals a differential requirement for pyruvate kinase in tumor cells. Cell. 2013;155(2):397-409.

Jha AK, Huang SC, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, Loginicheva E, e col. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. Immunity. 2015;42(3):419-30.

Kamphorst JJ, Nofal M, Commisso C, Hackett SR, Lu W, Grabocka E, e col. Human pancreatic cancer tumors are nutrient poor and tumor cells actively scavenge extracellular protein. Cancer Res. 2015;75(3):544-53.

Kato Y, Nakayama Y, Umeda M, Miyazaki K. Induction of 103-kDa gelatinase/type IV collagenase by acidic culture conditions in mouse metastatic melanoma cell lines. J Biol Chem. 1992;267(16):11424-30.

Klimp AH, Hollema H, Kempinga C, van der Zee AG, de Vries EG, Daemen T. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in human ovarian tumors and tumor-associated macrophages. Cancer Res. 2001;61(19):7305-9.

Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. Nat Rev Cancer. 2011;11(5):325-37.

Kotas ME, Medzhitov R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. Cell. 2015;160(5):816-27.

Kratochvill F, Neale G, Haverkamp JM, Van de Velde LA, Smith AM, Kawauchi D, e col. TNF Counterbalances the Emergence of M2 Tumor Macrophages. Cell Rep. 2015;12(11):1902-14.

Langston PK, Shibata M, Horng T. Metabolism Supports Macrophage Activation. Front Immunol. 2017; 8:61.

Laoui D, Van Overmeire E, Di Conza G, Aldeni C, Keirsse J, Morias Y, e col. Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population. Cancer Res. 2014;74(1):24-30.

Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. Cell. 2012;149(2):274-93.

Leopold JA, Dam A, Maron BA, Scribner AW, Liao R, Handy DE, e col. Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. Nat Med. 2007;13(2):189-97.

Liu D, Chang C, Lu N, Wang X, Lu Q, Ren X, e col. Comprehensive Proteomics Analysis Reveals Metabolic Reprogramming of Tumor-Associated Macrophages Stimulated by the Tumor Microenvironment. J Proteome Res. 2017;16(1):288-97.

Liu M, O'Connor RS, Trefely S, Graham K, Snyder NW, Beatty GL. Metabolic rewiring of macrophages by CpG potentiates clearance of cancer cells and overcomes tumor-expressed CD47-mediated 'don't-eat-me' signal. Nat Immunol. 2019;20(3):265-75.

Liu Y, Chen K, Wang C, Gong W, Yoshimura T, Liu M, e col. Cell surface receptor FPR2 promotes antitumor host defense by limiting M2 polarization of macrophages. Cancer Res. 2013;73(2):550-60.

Maciejczyk A, Lacko A, Ekiert M, Jagoda E, Wysocka T, Matkowski R, e col. Elevated nuclear S100P expression is associated with poor survival in early breast cancer patients. Histol Histopathol. 2013;28(4):513-24.

Maddox JF, Hachicha M, Takano T, Petasis NA, Fokin VV, Serhan CN. Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein-linked lipoxin A4 receptor. J Biol Chem. 1997;272(11):6972-8.

Maddox JF, Serhan CN. Lipoxin A4 and B4 are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: selective inactivation by dehydrogenation and reduction. J Exp Med. 1996;183(1):137-46.

Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. Nat Rev Clin Oncol. 2017;14(7):399-416.

Martin de Civetta MT, Civetta JD. [Carcinogenesis]. Salud Publica Mex. 2011;53(5):405-14.

Maya-Monteiro CM, Almeida PE, D'Avila H, Martins AS, Rezende AP, Castro-Faria-Neto H, e col. Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. J Biol Chem. 2008;283(4):2203-10.

Mayers JR, Wu C, Clish CB, Kraft P, Torrence ME, Fiske BP, e col. Elevation of circulating branched-chain amino acids is an early event in human pancreatic adenocarcinoma development. Nat Med. 2014;20(10):1193-8.

Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. Semin Cancer Biol. 2005;15(4):300-8.

McKinney JD, Honer zu Bentrup K, Munoz-Elias EJ, Miczak A, Chen B, Chan WT, e col. Persistence of Mycobacterium tuberculosis in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. Nature. 2000;406(6797):735-8.

Michelucci A, Cordes T, Ghelfi J, Pailot A, Reiling N, Goldmann O, e col. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(19):7820-5.

Mu X, Shi W, Xu Y, Xu C, Zhao T, Geng B, e col. Tumor-derived lactate induces M2 macrophage polarization via the activation of the ERK/STAT3 signaling pathway in breast cancer. Cell Cycle. 2018;17(4):428-38.

Munn LL. Cancer and inflammation. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2017;9(2).

Nagy C, Haschemi A. Time and Demand are Two Critical Dimensions of Immunometabolism: The Process of Macrophage Activation and the Pentose Phosphate Pathway. Front Immunol. 2015;6.

Nascimento-Silva V, Arruda MA, Barja-Fidalgo C, Villela CG, Fierro IM. Novel lipid mediator aspirin-triggered lipoxin A4 induces heme oxygenase-1 in endothelial cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2005;289(3):C557-63.

Nascimento-Silva V, Arruda MA, Barja-Fidalgo C, Villela CG, Fierro IM. Novel lipid mediator aspirin-triggered lipoxin A4 induces heme oxygenase-1 on endothelial cells. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2005; 289(3):C557-63

Netea-Maier RT, Smit JWA, Netea MG. Metabolic changes in tumor cells and tumor-associated macrophages: A mutual relationship. Cancer Lett. 2018; 413:102-9.

Nevala WK, Vachon CM, Leontovich AA, Scott CG, Thompson MA, Markovic SN. Evidence of systemic Th2-driven chronic inflammation in patients with metastatic melanoma. Clin Cancer Res. 2009;15(6):1931-9.

O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. Nature Reviews Immunology. 2016;16(9):553.

Organização Mundial da Saúde. Folha informativa – Câncer 2018 [internet]. Rio de janeiro; [acesso em março 2019]. Disponível em: www.paho.org

Palsson-McDermott EM, Curtis AM, Goel G, Lauterbach MA, Sheedy FJ, Gleeson LE, e col. Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1alpha activity and IL-1beta induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages. Cell Metab. 2015;21(1):65-80.

Penny HL, Sieow JL, Adriani G, Yeap WH, See Chi Ee P, San Luis B, e col. Warburg metabolism in tumor-conditioned macrophages promotes metastasis in human pancreatic ductal adenocarcinoma. Oncoimmunology. 2016; 5(8):e1191731

Poczobutt JM, De S, Yadav VK, Nguyen TT, Li H, Sippel TR, e col. Expression Profiling of Macrophages Reveals Multiple Populations with Distinct Biological Roles in an Immunocompetent Orthotopic Model of Lung Cancer. J Immunol. 2016;196(6):2847-59.

Porporato PE, Payen VL, De Saedeleer CJ, Preat V, Thissen JP, Feron O, e col. Lactate stimulates angiogenesis and accelerates the healing of superficial and ischemic wounds in mice. Angiogenesis. 2012;15(4):581-92.

Postovit LM, Seftor EA, Seftor RE, Hendrix MJ. A three-dimensional model to study the epigenetic effects induced by the microenvironment of human embryonic stem cells. Stem Cells. 2006;24(3):501-5.

Rath M, Muller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. Front Immunol. 2014; 5:532.

Remmerie A, Scott CL. Macrophages and lipid metabolism. Cell Immunol. 2018; 330:27-42.

Robichaud PP, Boulay K, Munganyiki J, Surette ME. Fatty acid remodeling in cellular glycerophospholipids following the activation of human T cells[S]. J Lipid Res. 2013; 54(10):2665-77

Rodriguez-Prados JC, Traves PG, Cuenca J, Rico D, Aragones J, Martin-Sanz P, e col. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. J Immunol. 2010;185(1):605-14.

Romero-Garcia S, Moreno-Altamirano MM, Prado-Garcia H, Sanchez-Garcia FJ. Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance. Front Immunol. 2016; 7:52.

Ruffell B, Affara NI, Coussens LM. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. Trends Immunol. 2012;33(3):119-26.

Sangaletti S, Tripodo C, Ratti C, Piconese S, Porcasi R, Salcedo R, e col. Oncogene-driven intrinsic inflammation induces leukocyte production of tumor necrosis factor that critically contributes to mammary carcinogenesis. Cancer Res. 2010;70(20):7764-75.

Schlager SI, Madden LD, Meltzer MS, Bara S, Mamula MJ. Role of macrophage lipids in regulating tumoricidal activity. Cell Immunol. 1983;77(1):52-68.

Sena LA, Li S, Jairaman A, Prakriya M, Ezponda T, Hildeman DA, e col. Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. Immunity. 2013;38(2):225-36.

Serhan CN, Chiang N. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. Br J Pharmacol. 2008;153 Suppl 1: S200-15.

Serhan CN, Hamberg M, Samuelsson B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984;81(17):5335-9.

Serhan CN, Maddox JF, Petasis NA, Akritopoulou-Zanze I, Papayianni A, Brady HR, e col. Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. Biochemistry. 1995;34(44):14609-15.

Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. Nat Immunol. 2005;6(12):1191-7.

Serhan CN, Sheppard KA. Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A4 by platelet 12-lipoxygenase in vitro. J Clin Invest. 1990;85(3):772-80.

Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, e col. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. J Cell Physiol. 2018;233(9):6425-40.

Shi Q, Le X, Wang B, Xiong Q, Abbruzzese JL, Xie K. Regulation of interleukin-8 expression by cellular pH in human pancreatic adenocarcinoma cells. J Interferon Cytokine Res. 2000;20(11):1023-8.

Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. J Clin Invest. 2012; 122(3):787-95.

Sica A, Saccani A, Mantovani A. Tumor-associated macrophages: a molecular perspective. Int Immunopharmacol. 2002;2(8):1045-54.

Simoes RL, De-Brito NM, Cunha-Costa H, Morandi V, Fierro IM, Roitt IM, e col. Lipoxin A4 selectively programs the profile of M2 tumor-associated macrophages which favour control of tumor progression. Int J Cancer. 2017;140(2):346-57.

Simoes RL, Fierro IM. Involvement of the Rho-kinase/myosin light chain kinase pathway on human monocyte chemotaxis induced by ATL-1, an aspirin-triggered lipoxin A4 synthetic analog. J Immunol. 2005;175(3):1843-50.

Simoes RL, Niconi-de-Almeida Y, da-Fe AR, Barja-Fidalgo C, Fierro IM. A synthetic analog of 15-epi-lipoxin A4 inhibits human monocyte apoptosis: involvement of ERK-2 and PI3-kinase. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2010;91(1-2):10-7.

Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, Baican C, Baican A, Peter H, e col. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. J Clin Invest. 2011;121(3):985-97.

Siveen KS, Kuttan G. Role of macrophages in tumour progression. Immunol Lett. 2009;123(2):97-102.
Soga T. Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming. Cancer Sci. 2013;104(3):275-81.

Stylianopoulos T, Martin JD, Chauhan VP, Jain SR, Diop-Frimpong B, Bardeesy N, e col. Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(38):15101-8.

Takano T, Fiore S, Maddox JF, Brady HR, Petasis NA, Serhan CN. Aspirin-triggered 15-Epi-Lipoxin A4 (LXA4) and LXA4 Stable Analogues Are Potent Inhibitors of Acute Inflammation: Evidence for Anti-inflammatory Receptors. J Exp Med. 1997;185(9):1693-704.

Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, e col. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. Nature. 2013;496(7444):238-42.

Van den Bossche J, O'Neill LA, Menon D. Macrophage Immunometabolism: Where Are We (Going)? Trends Immunol. 2017;38(6):395-406.

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science. 2009;324(5930):1029-33.

Vats D, Mukundan L, Odegaard JI, Zhang L, Smith KL, Morel CR, e col. Oxidative metabolism and PGC-1beta attenuate macrophage-mediated inflammation. Cell Metab. 2006;4(1):13-24.

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 Res. 2011;71(7):2550-60.

Wang D, Dubois RN. Eicosanoids and cancer. Nat Rev Cancer. 2010;10(3):181-93.

Warburg O. On the origin of cancer cells. Science. 1956;123(3191):309-14.

Wenes M, Shang M, Di Matteo M, Goveia J, Martin-Perez R, Serneels J, e col. Macrophage Metabolism Controls Tumor Blood Vessel Morphogenesis and Metastasis. Cell Metab. 2016;24(5):701-15.

Williams NC, O'Neill LAJ. A Role for the Krebs Cycle Intermediate Citrate in Metabolic Reprogramming in Innate Immunity and Inflammation. Front Immunol. 2018; 9:141.

Wise DR, Ward PS, Shay JE, Cross JR, Gruber JJ, Sachdeva UM, e col. Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of alpha-ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(49):19611-6.

World Health Organization. Cancer [Internet]. Rio de Janeiro; 2019 [acesso em 2019 março]. Disponível em: https://www.who.int/cancer/en/

Xie H, Hanai J, Ren JG, Kats L, Burgess K, Bhargava P, e col. Targeting lactate dehydrogenase-A inhibits tumorigenesis and tumor progression in mouse models of lung cancer and impacts tumor initiating cells. Cell Metab. 2014;19(5):795-809.

Yahaya MAF, Lila MAM, Ismail S, Zainol M, Afizan NA. Tumour-Associated Macrophages (TAMs) in Colon Cancer and How to Reeducate Them. J Journal of Immunology Research. 2019; 2019:9.

Yang W, Lu Z. Regulation and function of pyruvate kinase M2 in cancer. Cancer Lett. 2013;339(2):153-8.

Zhu X, Yang J, Gao Y, Wu C, Yi L, Li G, e col. The dual effects of a novel peptibody on angiogenesis inhibition and M2 macrophage polarization on sarcoma. Cancer Lett. 2018; 416:1-10.

ANEXO A – Principais produções e prêmios durante o período do doutorado

1. Artigos Completos publicados em periódicos

SIMÕES, R. L.; **DE-BRITO, N. M.**; CUNHA-COSTA, H.; MORANDI, V.; FIERRO, I. M.; ROITT, I. M.; BARJA-FIDALGO, C. Lipoxin A_4 selectively programs the profile of M2 tumor-associated macrophages which favour control of tumor progression. International Journal of Cancer (Print), v. 140, p. 346-357, 2017.

de-Brito, N.M; Cunha-Costa, H; Simões, R.L.; Barja-Fidalgo, C. Lipoxin-induced phenotypic changes in $CD115^{+}LY6C^{high}$ monocytes TAM precursors inhibits tumor development. *Front. Oncol.* 9:540, 2019. doi: 10.3389/fonc.2019.00540.

2. Artigos submetidos ou em processo de submissão

De-Brito, N.M; Duncan-Moretti, J.; Cunha-Costa, H; Saldanha-Gama, R.; Paula-Neto, H.A.; Dorighello, G.; Simões, R.L.; Barja-Fidalgo, C. AEROBIC GLYCOLYSIS IS A METABOLIC REQUIREMENT TO MAINTAIN THE M2-LIKE POLARIZATION OF TUMOR-ASSOCIATED MACROPHAGES. Journal of Biological Chemistry.

3. Prêmios

1. Bolsa de doutorado Nota 10, FAPERJ.

2. Oral Presentation award in the Doctorate Category, XIX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology - SBBC.

ANEXO B – Apresentações de trabalho em simpósios, workshops e congressos

1. XIX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology (Congresso - São Paulo - 2018).

Effects of lipoxins on the metabolic profile of tumor-associated macrophages - Trabalho apresentado em formato de poster e apresentação oral – concorrendo ao melhor trabalho na categoria doutorado

2. II Worshop on inflammation (Workshop – Rio de Janeiro – 2018).

Effects of lipoxins on the metabolic profile of tumor-associated macrophages - Trabalho apresentado em formato de apresentação oral – concorrendo ao melhor trabalho

3. 13th World Congress on Inflammation (Congresso – Londres – 2017).

Lipoxin A4 selectively programs the profile of M2 tumor-associated macrophages which favour control of tumor progression – trabalho apresentado em formato de apresentação oral

4. XI Simpósio de Oncobiologia (Simpósio – Rio de Janeiro – 2017)

In vivo evaluation of the lipoxin effects on tumor-associated macrophages profile – Trabalho apresentado em formato de poster.

5. XVIII Congress of the Brazilian Society for Cell Biology (Congresso – São Paulo – 2016)

Lipoxin A4 selectively shifts the tumor-associated macrophage profile leading to control of tumor progression – Trabalho apresentado em formato de poster.

4. XIII Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular (Simpósio – Rio de Janeiro/Búzios- 2015)

Lipoxin A4 selectively shifts the tumor-associated macrophage profile leading to control of tumor progression – Trabalho apresentado em formato de poster.