

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Instituto de Química

ATIVIDADE ANTITUMORAL DO CLOTRIMAZOL EM UM MODELO
DE MELANOMA MURINO: INIBIÇÃO DA PI3K E INDUÇÃO DA
REPOLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR

Rio de Janeiro

2021

ALAN CLAVELLAND OCHIONI

ATIVIDADE ANTITUMORAL DO CLOTRIMAZOL EM UM MODELO
DE MELANOMA MURINO: INIBIÇÃO DA PI3K E INDUÇÃO DA
REPOLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR

Tese apresentada ao corpo docente da Pós-
graduação Strictu Sensu nível de Doutorado do
Programa de Bioquímica do Instituto de
Química como parte dos requisitos necessários
à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica

Orientador(a): Patrícia Zancan

2021

Rio de Janeiro

2021

Ficha Catalográfica

OCHIONI, Alan Clavelland

Atividade antitumoral do clotrimazol em um modelo de melanoma murino: inibição da PI3K e indução da repolarização de macrófagos associados ao tumor. Rio de Janeiro, UFRJ, Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química, IQ, 2021.

xxiii, 89f.

Tese – Doutor em Bioquímica

1. Câncer. 2. Inflamação. 3. Lactato. 4. Citotoxicidade. 5. PI3K

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Atividade antitumoral do clotrimazol em um modelo de melanoma murino: inibição da PI3K e indução da repolarização de macrófagos associados ao tumor.

Atividade antitumoral do clotrimazol em um modelo de melanoma murino: inibição da PI3K e indução da repolarização de macrófagos associados ao tumor

Nome do autor: Alan Clavelland Ochioni

Orientador (es): Prof (a) Dra Patrícia Zancan

Tese de Doutorado submetida ao programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de doutor em Ciências (Bioquímica)

Aprovado por:

Presidente prof(a): Patricia Zancan



Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso (IMPG/UFRJ) – Titular interno

Cristiane Dinis Ano Bom (IQ/UFRJ) – Titular interno

João Alfredo de Moraes Gomes da Silva (ICB/UFRJ) – Titular externo

João Paulo de Biaso Viola (INCA) – Titular externo

Marcos Dias Pereira (IQ/UFRJ) (IQ/UFRJ) – Suplente interno

Jamila Alessandra Perini Machado (UEZO) – Suplente externo

Rio de Janeiro

Maio de 2021

Agradecimentos

Ao longo de minha vida, seja ela acadêmica ou não, sempre tive pessoas que ajudaram e acreditaram em mim e no meu potencial, por isso dedico a todas as pessoas importantes na minha vida, que eles sempre estejam comigo nos bons e maus momentos.

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre me guiando e fazendo acreditar mesmo quando tudo está perdido, sempre colocou uma luz quando o caminho ficava difícil.

Agradeço aos meus pais Juracema Clavelland Ochioni e Antonio Ochioni Barbosa, por todo amor e carinho que me deram sempre desde a minha infância até aqui. E por sempre me ajudarem e me apoiarem em tudo o que fiz.

Agradeço a minha Irmã Aline Clavelland Ochioni e ao meu cunhado Victor Gall, por sempre me apoiarem e me ajudarem quando mais precisei.

Agradeço a minha avó que está no céu Olinda Baptista Clavelland por sempre me apoiar e amar como um filho, sei que sempre estará olhando por mim.

Agradeço aos meus amigos que são quase como irmãos para mim, que sempre estiveram comigo me ajudando nos maus momentos, em especial Rafael Gonçalo, Vinicius Rocha Miranda, Guilherme Calory, Daniel Mesquita e Pedro Henrique Sousa Fernandez, que possamos estar sempre juntos nos bons e maus momentos agradeço a todos vocês.

Agradeço a minha companheira, amiga, namorada (Futuramente minha noiva!!) Thayane da Encarnação Sá Guimarães, por todo carinho, paciência e companheirismo nessa caminhada tão difícil. Tem certeza de que você foi uma das peças-chave para eu ter chegado até aqui.

Agradeço a minha Orientadora Patrícia Zancan, pela paciência, as broncas, os ensinamentos (afinal de contas esse é trabalho de uma orientadora!), sei que não deve ter sido nada fácil ter me aturado nesses quatro anos, mas agradeço imensamente a oportunidade de ter me aceitado como seu aluno.

Agradeço a equipe do Laboratório de Oncobiologia Molecular, que sempre tiveram toda a paciência do mundo para me ensinar e me aturar nesses anos, em especial Ricardo Imbroisi, Angelica Lauria, Jessica Ristow, e é claro minha aluna de IC que agora é mestranda Deborah Dias. Sem vocês não teria chegado até aqui.

Agradeço ao Laboratório de Enzimologia e Controle do Metabolismo, principalmente por me ajudarem com meu protocolo animal e por terem me ajudado com diversos experimentos em especial Thaina Magalhães, João Gabriel Bernardo e é claro o professor doutor (Ele gosta de ser chamado assim!), Mauro Sola-Penna por toda ajuda, paciência e pelos ótimos momentos.

E a todos que são importantes na minha vida e que me ajudaram na caminhada até aqui, mesmo que não tenham sido citados aqui, contribuíram para a pessoa que sou hoje.

RESUMO

O câncer é um grave problema de saúde global e tem sido uma das principais causas de morbimortalidade nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Existem muitos elementos que contribuem para o estabelecimento e a progressão do tumor, um dos quais está relacionado a alterações no metabolismo das células tumorais. O efeito Warburg ou glicólise aeróbica direciona o fluxo glicolítico para a produção de lactato e contribui para o desenvolvimento do tumor. Estudos prévios demonstraram que a alta produção de lactato pelas células tumorais está relacionada à polarização de macrófagos, contribuindo para a agressividade do tumor. Nesse contexto, a ação de fármacos moduladores do metabolismo tumoral pode diminuir a produção de lactato por estas células. Dentre estes destacamos o clotrimazol (CTZ), um modulador negativo da glicólise nas células tumorais. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar se a inibição do metabolismo tumoral e, conseqüentemente da produção de lactato, pelo CTZ poderia promover a redução da polarização de macrófagos para um perfil anti-inflamatório contribuindo para a inibição da tumorigênese. Neste trabalho foram utilizadas células de melanoma murino (B16F10) e linhagens celulares de macrófagos murinos (J774 e Raw 264.7), além de macrófagos murinos em cultura primária (BMDM). Para os ensaios *in vivo*, células B16F10 foram injetadas por via subcutânea no dorso de camundongos C57BL/6J os quais foram tratados por 15 dias com CTZ. Nossos resultados mostram que o CTZ reduz o crescimento tumoral através da modulação do metabolismo celular. Adicionalmente, observamos uma menor infiltração de macrófagos nos tumores dos animais tratados. Os macrófagos remanescentes no microambiente tumoral apresentaram um perfil pró-inflamatório, ou seja, antitumoral. Estes resultados foram confirmados em experimentos com linhagens celulares em cultura e

indicam que: a) em células tumorais o CTZ inibe a via da PI3K promovendo a inibição do metabolismo glicolítico tumoral com consequente redução da produção de lactato por estas células; b) o lactato secretado pelas células tumorais induz a polarização de macrófagos para um perfil M2, ou seja, pró-tumoral; c) o CTZ induz a repolarização dos macrófagos para um perfil M1 (pró-inflamatório) contribuindo para sua ação anticâncer. Por fim, nossos resultados demonstram que este fármaco apresenta efeitos promissores agindo sobre ambos os tipos celulares atuando, especialmente, no *crosstalk* entre células tumorais-macrófagos.

ABSTRACT

Cancer is a serious global health problem and has been a major cause of morbidity and mortality in developed and developing countries. There are many elements that contribute to the establishment and progression of the tumor, one of which is related to changes in the metabolism of tumor cells. The Warburg effect or aerobic glycolysis directs the glycolytic flow to the production of lactate and contributes to the development of the tumor. Previous studies have shown that high lactate production by tumor cells is related to macrophage polarization, contributing to tumor aggressiveness. In this context, the action of drugs that modulate tumor metabolism may decrease the production of lactate by these cells. Among these drugs we highlight clotrimazole (CTZ), a negative modulator of glycolysis in tumor cells. The present study aimed to evaluate whether inhibition of tumor metabolism and, consequently, lactate production, could promote the reduction of macrophage polarization to an anti-inflammatory profile contributing to the inhibition of tumorigenesis. In this work, murine melanoma cells (B16F10) and murine macrophage cell lines (J774 and Raw 264.7) were used, in addition to murine macrophages in primary culture (BMDM). For in vivo assays, B16F10 cells were injected subcutaneously into the back of C57BL/6J mice which were treated for 15 days with CTZ. Our results show that CTZ reduces tumor growth by modulating cellular metabolism. Additionally, we observed a decreased macrophage infiltration in the tumors of the treated animals. The remaining macrophages in the tumor microenvironment showed a pro-inflammatory, *i.e.* anti-tumor, profile. These results were confirmed by experiments with cultured cell lines and indicate that: a) in tumor cells, CTZ inhibits the PI3K pathway promoting the inhibition of tumor glycolytic metabolism with a consequent reduction in lactate production; b) lactate secreted by the tumor cells induces the

polarization of macrophages to a M2 profile, *i.e.* pro-tumor macrophages; c) CTZ induces the repolarization of macrophages to a M1 profile (pro-inflammatory and anti-tumor) contributing to its anti-cancer action. Finally, our results demonstrate that this drug has promising effects acting on both cell types acting, especially, on the crosstalk between tumor-macrophage cells.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Célula normal sob ação dos agentes iniciadores.** Os agentes carcinogênicos provocam diversas mutações em genes importantes em células normais, preparando-as para os próximos estágios (Elaboração própria)..... 3
- Figura 2: Células com ação contínua de agentes promotores.** Exposição prolongada de células iniciadas a agentes promotores ocasionando no surgimento de um tumor (Elaboração própria). 3
- Figura 3: Estabelecimento do tumor no órgão.** Multiplicação de forma desordenada das células cancerosas, ocasionando no desenvolvimento de uma massa tumoral. Neste estágio ocorre o surgimento dos primeiros sinais clínicos (Elaboração própria) 3
- Figura 4: Etapas de evolução do melanoma.** O esquema representa o estágio de evolução a partir de uma população de melanócitos confinados na epiderme, estágios mais brandos e as etapas mais agressivas quando este invade outras áreas e órgãos (adaptado de MILLER, 2006)..... 6
- Figura 5: Esquema de mecanismo de ação do efeito Warburg em células tumorais:** este fenômeno é definido como um aumento na taxa de captação de glicose e produção de lactato, mesmo na presença de oxigênio, chamado também de glicólise aeróbica, ocasionando a rápida geração de energia, dentre outras possíveis funções que esse fenômeno gera para a célula tumoral. As siglas representam Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês ROS) e o Ciclo do Ácido Cítrico (do inglês TCA) (Elaboração própria, baseada em FU et al., 2017). 10

Figura 6: Via de ativação de PI3K/AKT: A sinalização de fatores de crescimento leva a estimulação de receptores tirosina quinases e receptores acoplados a proteína G, dessa forma ocorre a ativação de PI3K, levantando a formação do segundo mensageiro fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), levando ao recrutamento de AKT e sua ativação (Elaboração própria, baseada em SHI et al., 2019)..... 14

Figura 7: Rede de sinalização de AKT. AKT fosforila substratos importantes para a regulação de diversos eventos celulares, incluindo substratos multifuncionais. P representa a fosforilação inibitória em azul (Elaboração própria baseada em XU et al., 2020)..... 15

Figura 8: Visão geral dos complexos mTORC1 e mTORC2: observa-se os principais substratos ativados por cada um dos complexos, muitos deles estão envolvidos no crescimento e no metabolismo celular. Vale observar que o complexo mTORC2 ativa AKT, mantendo a via de sinalização ativa (Elaboração própria, baseada em YOON & CHOI, 2016)..... 16

Figura 9: Polarização de macrófagos: Estímulos diferentes, ocasionam diferentes perfis de polarização em macrófagos. O perfil M1 é induzido por LPS/IFN- γ , e está frequentemente associado ao combate direto do patógeno. A polarização em M2 é feita principalmente, na regulação do processo inflamatório (Elaboração própria)..... 19

Figura 10: Subtipos de macrófagos M2: O perfil de polarização em M2 é muito diversificado apresentando três subtipos principais. O M2a é estimulado principalmente por IL-4 e IL-13, sendo oposto ao M1; o estado M2b é estimulado principalmente por IL-1 e complexos imunológicos (CI's). Já o estado M2c é estimulado por IL-10 e glicocorticoides e está envolvido principalmente no reparo tecidual. Na parte inferior de cada representação

dos subtipos de macrófagos estão descritas as citocinas liberadas por eles (Elaboração própria). 20

Figura 11: Os hallmarks do câncer. Esta figura mostra os principais eventos e mecanismos que estão associados ao desenvolvimento e progressão da célula tumoral (adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2011). 22

Figura 12: Polarização de macrófagos no microambiente tumoral: O lactato proveniente do metabolismo da célula tumoral sinaliza em células de macrófagos presentes no tecido para a polarização em um perfil semelhante ao M2 (Elaboração própria, baseada em COLEGIO, 2016). 24

Figura 13: Sinalização parácrina que ocorre entre a célula tumoral e o macrófago associado ao tumor: Lactato liberado fruto do metabolismo da célula tumoral é sinalizado na célula tumoral aumentando a expressão de fatores ligados a angiogênese como o VEGF, aumentando a vascularização e o aporte de nutrientes para a célula tumoral (Elaboração própria baseada em COLEGIO, 2016). 25

Figura 14: Influência dos macrófagos associados ao tumor em outras células presentes no microambiente tumoral: Os macrófagos associados ao tumor interagem com outros tipos celulares além da própria célula tumoral, para promover seu crescimento e invasão, além de diminuir a resposta imune no combate ao tumor (Elaboração própria). 26

Figura 15: Forma estrutural do Clotrimazol..... 29

Figura 16: Método de preparo dos meios condicionados: Foi utilizada um garrafa de B16F10 e está foi replicada para 2 garrafas cultivadas por 48h ou 72h em normoxia 39

- Figura 17: Modelo in vivo:** Esquema do protocolo animal seguido no estudo. 46
- Figura 18: Efeitos do tratamento de CTZ sobre o peso corporal dos animais:** Valores médios para o peso corporal dos camundongos no final do experimento (média \pm erro padrão; n = 6)..... 47
- Figura 19: Efeitos do tratamento de CTZ sobre os níveis de AST e ALT:** Níveis séricos de AST e ALT medidos por espectrofotometria das amostras de soro dos animais extraído ao final do tratamento. Valores médios para a atividade das enzimas hepáticas AST e ALT no soro dos animais (média \pm erro padrão; n = 6)..... 48
- Figura 20: Efeitos do CTZ sobre o desenvolvimento de tumores de B16F10:** Gráfico de dispersão do peso dos tumores, comparando o controle com o tratamento CTZ (a barra e as barras de erro em cada gráfico de dispersão são a média \pm erro padrão; n = 6). * indica p <0,05 em comparação com o controle (teste t de Student). Imagem de tumores representativos extraídos de animais não tratados e tratados com CTZ..... 48
- Figura 21: Efeito do CTZ no conteúdo de lactato do tecido tumoral:** A partir de uma mesma quantidade de tecido tumoral pesado para ambos os grupos o lactato foi medido por espectrofotometria. Barras são médias \pm erro padrão de seis animais diferentes em cada grupo (n = 6). * indica p <0,05 em comparação com o controle (teste t de Student)..... 49
- Figura 22: Efeito do CTZ na expressão de Ldh1 e Mct1 em tumores:** expressão relativa de mRNA de lactato desidrogenase A (Ldh1) e transportador de monocarboxilato (Mct1) de tecidos tumorais medidos por análise de qPCR (as barras representa a média \pm erro padrão de um n = 6 calculados por $2^{-\Delta\Delta Ct}$; * p<0,05, Teste não paramétrico de Mann-Whitney em comparação ao controle). 50

Figura 23: Infiltração de macrófagos no tecido tumoral após tratamento com CTZ:

expressão relativa de mRNA do marcador de superfície de macrófago F4/80 (Adgre1) de tecidos tumorais medidos por análise qPCR (as barras são a média \pm erro padrão de um n = 6 calculados por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ * p<0,05, teste não paramétrico de Mann-Whitney em comparação ao controle)..... 51

Figura 24: Polarização de macrófagos remanescentes nos tumores após tratamento com CTZ:

expressão relativa de mRNA de genes de resposta imune (Nos2, Fpr2, Tnfa, Il12b, Ccl2, Il1b, Arg1, Egr2 e Mrc1) a partir de tecidos tumorais medidos por análise de qPCR (as barras são médias \pm erro padrão n = 6 calculados pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$; * p <0,05, teste não paramétrico de Mann-Whitney em comparação ao controle)..... 51

Figura 25: Efeitos do CTZ em proteínas envolvidas na inflamação e angiogênese de tumores:

Análise de Western blot de proteínas associadas à resposta inflamatória do tumor: pNF- κ B (Ser536) e NF- κ B foram quantificados usando o software ImageJ e a quantificação de cada coloração é plotada nos painéis normalizados pela quantificação da coloração de proteína total (barras são média \pm erro padrão, n = 3, * p <0,05, teste t de Student). A análise de Western blot de VEGF foi quantificada usando o software ImageJ e a quantificação de cada coloração é plotada nos painéis normalizados pela quantificação da coloração de β - actina (as barras são a média \pm erro padrão, n = 3, * p < 0,05, teste t de Student). 52

Figura 26: Ação do CTZ na viabilidade celular de B16F10: Contagem de células realizados por azul tripan o gráfico foi plotado utilizando o número de células viáveis. As células B16F10 foram tratadas com diferentes concentrações de CTZ (0 - 50 μ M) por 24h. Os valores plotados são a média \pm erro padrão de três experiências independentes (n = 3). Os dados foram analisados usando ANOVA de um fator, seguido pelo pós-teste de Tukey; * indica $p < 0,05$ em comparação com o controle do mesmo grupo..... 53

Figura 27: Efeito do CTZ sobre a captação de glicose e a produção de lactato em células B16F10: Ensaio em citometria de fluxo para captação de glicose. Dosagem de lactato feita por espectrofotometria. 20 μ M de citocalasina B (CB) utilizada como controle positivo para a inibição da captação de glicose. Para ambos os ensaios foram os dados foram analisados por ANOVA de um fator, seguido do pós-teste de Tukey; * indica $p < 0,05$ em comparação com o controle do mesmo grupo.54

Figura 28: Efeito do CTZ sobre a Atividade Enzimática de enzimas da glicólise e PPP: Atividade enzimática de HK, PFK e PK da via glicolítica e de G6PDH da PPP foi analisada conforme descrito em Metodologia após 24h de tratamento com CTZ (0-40 μ M). Os valores representam média \pm erro padrão de, pelo menos, dois experimentos independentes. *indica $p \leq 0.05$ comparado ao controle. 55

Figura 29: CTZ e atividade redutora mitocondrial: ensaio realizado por MTT, os valores plotados são a média \pm erro padrão de três experiências independentes (n = 3). Os dados foram analisados por ANOVA de um fator, seguida do pós-teste de Tukey e * médias $p < 0,05$ em comparação com o controle do mesmo grupo..56

Figura 30: Efeito do CTZ na via de sinalização de PI3K e ERK 1/2: Western blot representativo de AKT total e fosforilada, p70S6K, S6 e ERK1/2. A sinalização da insulina foi analisado através de um lisado celular de B16F10 tratadas com 10 μ M de CTZ ou 0,5 μ M de LY294002 por 24h estimulados ou não com 100 nM de insulina por 30 min.....57

Figura 31: Quantificação dos Western blot: pAKT (Thr308)/AKT, pAKT (Ser473)/AKT, p-p70S6K (Thr421/Ser424)/GAPDH, pS6 (Ser235/236)/GAPDH e pERK1/2 (Thr202/Tyr204)/ERK1/2 foram quantificados usando o software ImageJ. GAPDH foi usado como controle de carregamento. Os valores são a média \pm erro padrão de três experimentos independentes (n = 3). * indica $p < 0,05$ em comparação com o controle (ANOVA de dois fatores, seguido pelo pós-teste de Tukey)..... 57

Figura 32: Efeito do CTZ em B16F10 incubada com meio condicionado de Raw 264.7: Número de células B16F10 viáveis tratadas por 24h com MC de Raw 264,7 tratadas (ou não) com 20 ng/mL de IL-4 durante 24 h. Os dados foram analisados usando ANOVA de um fator seguida pelo pós-teste de Tukey; * indica $p < 0,05$ em comparação com o controle do mesmo grupo. Proliferação de células B16F10 avaliada pelo número de células viáveis na mesma condição apresentada anteriormente (para estatísticas, foi aplicada ANOVA de dois fatores seguida pelo pós-teste de Tukey).....59

Figura 33: Efeito do meio condicionado de B16F10 em J774: Produção de lactato pelas células B16F10 após incubação por 48h e 72h. Expressão relativa de mRNA do marcador de polarização M1 (Fpr2) e marcador de polarização M2 (Egr2) avaliada por qPCR (as barras são médias \pm erro padrão calculado por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de um n = 3). As células J774 foram incubadas com MC de B16F10. Controle representa meio sem células. * indica $p < 0,05$ em comparação com o controle (teste de Mann-Whitney). 60

Figura 34: Efeito do lactato na polarização de macrófagos: Expressão relativa de mRNA de Fpr2 e Egr2 em células Raw 264.7 tratadas com 100 ng/mL LPS + 20 ng/mL IFN γ , 20 ng/mL IL-4 ou 10-30 mM de lactato de sódio por 24h avaliado por qPCR (n = 3). Expressão relativa de Arg1 em células J774 e Raw 264.7 tratadas ou não com lactato de sódio 30 mM avaliado por qPCR (n = 3). Expressão relativa de Fpr2, Egr2 e Arg1 em BMDM tratados com 100 ng/mL LPS + 20 ng/mL IFN γ , 10 ng/mL IL-4 ou 30 mM de lactato de sódio por 24h avaliado por qPCR (n = 3). Para todos os qPCR as barras são médias \pm erro padrão calculados por $2^{-\Delta\Delta Ct}$. * indica p <0,05 em comparação com o controle (teste de Mann-Whitney)..... 60

Figura 35: Repolarização de J774: Expressão relativa de mRNA de Fpr2 ou Egr2 em J774 tratada conforme descrito na sessão de Materiais e Métodos e avaliada por qPCR (as barras são médias \pm erro padrão calculado por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de um n= 3). * indica p <0,05 em comparação com o controle (teste de Mann-Whitney). 61

Figura 36: Viabilidade celular de macrófagos tratados com CTZ: Viabilidade celular J774 e Raw 264,7 avaliada por MTT após tratamento com CTZ por 24h (n = 3). A direita: Viabilidade de Raw264.7 polarizada para M1 ou M2 após o tratamento com CTZ, conforme descrito na sessão de Materiais e Métodos (n = 3). Os dados foram analisados por ANOVA de um fator, seguida do pós-teste de Tukey. * indica p<0,05 em comparação com o controle do mesmo grupo.. 62

Figura 37: Ação do CTZ na repolarização de macrófagos: Ensaio de qPCR da linhagem Raw 264.7 e de BMDM após tratamento com 30 mM de lactato de sódio e/ou 10 μ M de CTZ. As barras são médias \pm erro padrão de um n=3 calculados por $2^{-\Delta\Delta Ct}$. * indica p<0,05 em comparação com o controle (teste de Mann-Whitney). 63

Figura 38: Expressão de iNOS e Arg1 em BMDM tratados com CTZ, lactato e IL-4: A

expressão de iNOS e Arg1 foram avaliadas por Western blot. Os gráficos de barras representam quantificações médias de imunoblots de pelo menos três experimentos independentes. * indica $p < 0,05$ em comparação com o controle para a mesma proteína e # indica $p < 0,05$ entre as condições marcadas (teste t de Student). 64

Figura 39: Ação do CTZ em células tumorais e macrófagos presentes no microambiente tumoral: CTZ interfere com o metabolismo celular tumoral, inibindo a sinalização de PI3K na célula, atua diminuindo a infiltração e afetando a polarização de macrófagos presentes no microambiente. 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Meios de Reação Atividade Enzimática.....	37
Tabela 2: Lista de primers utilizados	42
Tabela 3: Sondas Taqman utilizadas.....	43
Tabela 4: Anticorpos Utilizados.....	44

LISTA DE SIGLAS

ATP	Adenosina Tri-Fosfato
ACLY	Atp citrato liase
AKT	Proteína Quinase B
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
ROS	Sigla do inglês de Espécies reativas de oxigênio
G6PDH	Glicose 6-fosfato desidrogenase
HK	Hexoquinase
HIF-1 α	Fator indutor de hipóxia 1 alfa
IFN- γ	Interferon gama
LPS	Lipopolissacarídeos
LDH	Lactato desidrogenase
TAM	Sigla do Inglês para Macrófagos associadas ao tumor
MAPK	Proteína quinase-ativada por mitógenos
MCT	Transportadores de monocarboxilatos

MTT	brometo de 3-(4,5dimetitiazol-2-il)-2,5difeniltetrazólio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NAD ⁺	Nicotinamida Adenosina Dinucleotídeo
NADP ⁺	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NFκβ	Fator nuclear kappa B
NK	Natural killer
PAMP	Padrões moleculares associados a superfície dos patógenos
PFK	Fosfofruto quinase
PK	Piruvato quinase
PIP ₂	fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP ₃	fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PI3K	fosfatidilinositol-3-quinase
mTOR	Alvo de Rapamicina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1- Introdução.....	1
1.1 – Câncer.....	1
1.1.1 – Câncer do tipo melanoma.....	4
1.1.2 – Epidemiologia e tratamento do melanoma.....	6
1.2 – Metabolismo da célula tumoral.....	8
1.2.2 – Vias importantes para o desenvolvimento e manutenção do perfil metabólico tumoral.....	13
1.2.2.1 – Via PI3K/AKT/mTOR e sua importância na tumorigênese.....	13
1.3 - Macrófagos: Características.....	17
1.4 – Sistema Imune e Câncer	21
1.4.1 – Polarização de macrófagos e o desenvolvimento tumoral.....	23
1.5 – CLOTRIMAZOL.....	28
1.5.1 – Clotrimazol e seu uso no tratamento como antitumoral	29
2- Objetivo.....	32
2.1 - Objetivo Geral.....	32
2.2 – Objetivos Específicos.....	32

3- Metodologia.....	33
3.1 - Cultura de células.....	33
3.2 - Tratamento com CTZ.....	33
3.3 – Experimento in vivo.....	34
3.4 - Viabilidade Celular.....	34
3.5 – Dosagem de Lactato.....	35
3.6 – Captação de Glicose.....	36
3.7 – Atividade Enzimática.....	37
3.8 – Avaliação da polarização de macrófagos.....	39
3.9- Extração de macrófagos derivados de medula óssea.....	40
3.10 – PCR em tempo real.....	42
3.11 – Preparo das amostras para Western Blot.....	43
3.12- Análise estatística.....	45
4 - Resultados.....	46
4.1 – Efeitos do CTZ na tumorigênese, produção de lactato e polarização de macrófagos em modelo animal.....	46
4.2 – CTZ reduz a viabilidade de células de melanoma de camundongo.....	53
4.3 – Efeito do CTZ sobre o metabolismo de glicose.....	54

4.4 – CTZ e atividade redutora mitocondrial.....	55
4.5 – CTZ e o efeito sobre a fosforilação de proteínas importantes da via PI3K e MAPK	56
4.6 – Ação do CTZ em células B16F10 com meio condicionado de macrófagos.....	58
4.7 - Efeitos do lactato e CTZ na polarização de macrófagos.....	58
5- Discussão.....	65
6-Conclusões.....	73
7-Referências.....	75
8- Anexos.....	89
8.1. Manuscrito submetido para publicação no periódico Carcinogenesis: “Clotrimazole presents anticancer properties against a mouse melanoma model acting as PI3K inhibitor and inducing repolarization of tumor-associated macrophages”	90

1-Introdução

1.1 – Câncer

No último levantamento feito pela Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*, WHO) em 2018, o câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo, com aproximada 9,6 milhões de mortes. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2020) e a WHO, o câncer é um conjunto de doenças que podem acometer diversos órgãos do corpo sendo sua principal característica o crescimento desordenado das células que invadem outros órgãos e tecidos num processo denominado metástase. Em homens os cânceres de pulmão, fígado e próstata são os mais comuns; enquanto nas mulheres, os tipos colorretal, pulmonar, cervical, da tireóide e de mama são os mais frequentes (INCA, 2020).

Existem diversos fatores que auxiliam no surgimento de um tumor como, por exemplo, a exposição a agentes carcinogênicos (radiação e produtos químicos), fatores hereditários como mutações em alguns genes também contribuindo para a maior chance de desenvolvimento de um tumor. Além disso, os hábitos alimentares têm sido associados à suscetibilidade no desenvolvimento de alguns tipos de câncer (ACCARDI *et al.*, 2019). Embora tal diversidade de fatores, o processo de formação de uma célula tumoral é de certa forma, comum a muitos tipos de cânceres. Este processo possui diversas causas, que podem ser agrupados em dois tipos básicos de agentes causadores da carcinogênese: os agentes genotóxicos, que são agentes causadores de dano diretamente ao DNA da célula; e os agentes não-genotóxicos que causam alteração no padrão de expressão gênica principalmente em fatores relacionados ao crescimento e divisão celular (KLAUNING & WANG, 2017), como o estresse oxidativo que pode tanto causar alterações no DNA quanto alterações no crescimento da célula (KLAUNING & WANG, 2017;

ISHIKAWA *et al.*, 2008). Dessa maneira o processo de formação de uma célula tumoral apresenta diversas fontes.

Os cânceres surgem devido a uma série de mutações específicas que se acumulam, ocasionando efeitos como por exemplo suprimir a atividade de um gene ou alterar sua atividade (GRIFFITHS, 2016). As mutações que ocorrem em uma célula podem aumentar sua habilidade de proliferação ou diminuir a suscetibilidade a via de apoptose (JIA *et al.*, 2015). Existem mutações que são importantes para o aparecimento e desenvolvimento do câncer: as oncogênicas, que são mutações relacionadas aos proto-oncogenes e as mutações em genes supressores de tumor. Os proto-oncogenes são genes responsáveis por codificar proteínas importantes relacionadas a fatores de crescimento e controle do ciclo celular. Quando ocorre a mutação em um determinado tipo celular, devido à exposição por diversos fatores descritos acima, tem-se início o processo chamado de carcinogênese (MÜNCH *et al.*, 2019; INCA, 2019). A carcinogênese consiste na conversão de uma célula normal em uma célula maligna, um processo complexo que ocorre em três estágios: iniciação, promoção e progressão (INCA, 2019). Nos estágios de *iniciação* o material genético que está exposto à ação de agentes mutagênicos sofre modificações em algum(ns) gene(s). Neste estágio, a detecção clínica do tumor ainda não é possível (**Figura 1**). Já no estágio de *promoção*, as células que foram iniciadas, sofrem a ação contínua de outros agentes carcinogênicos fazendo com esta progrida para um estágio mais grave ou, caso haja a suspensão da influência desses agentes mutagênicos, pode haver reversão do processo de formação do tumor (**Figura 2**). No estágio de *progressão*, as células que deram continuidade ao processo de formação tumoral se replicam descontroladamente e de forma irreversível. Nesta fase o câncer já está instalado,

ocorrendo sua evolução até o aparecimento dos primeiros sinais clínicos (**Figura 3**) (INCA, 2019).

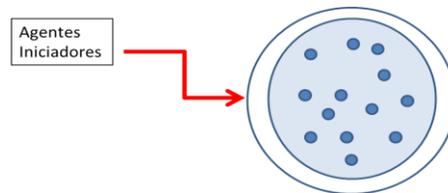


Figura 1: Célula normal sob ação dos agentes iniciadores. Os agentes carcinogênicos ou agentes iniciadores provocam diversas mutações em genes importantes em células normais, preparando-as para os próximos estágios (Elaboração própria).

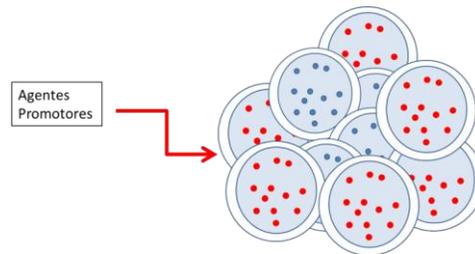


Figura 2: Células com ação contínua de agentes promotores. Exposição prolongada de células iniciadas a agentes promotores ocasionando no surgimento de um tumor (Elaboração própria).

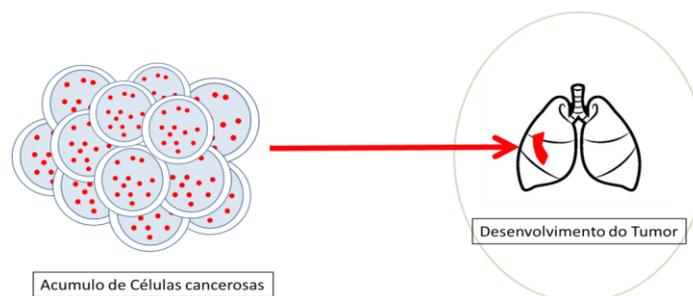


Figura 3: Estabelecimento do tumor no órgão. Multiplicação de forma desordenada das células cancerosas, ocasionando no desenvolvimento de uma massa tumoral. Neste estágio ocorre o surgimento dos primeiros sinais clínicos (Elaboração própria).

A célula cancerosa possui diversos fatores ou características que auxiliam seu crescimento como: a proliferação descontrolada, resistência à morte celular e reprogramação metabólica. A célula tumoral possui uma vasta gama de agentes reguladores de malignidade, que auxiliam no seu desenvolvimento. Estes podem incluir receptores de fatores de crescimento, que são proteínas transmembranares que possuem atividade enzimática e são ligadas a eventos como a proliferação celular. Além destes, reguladores de ciclo celular e fatores relacionados à reprogramação metabólica podem estar envolvidos, pois nas células tumorais foi observado que o metabolismo celular alterado é crucial para o desenvolvimento do tumor (JIA *et al.*, 2015; WILLIAMS & STOEBER, 2012).

1.1.1 – Câncer do tipo melanoma

O melanoma consiste no aparecimento de mutações nos melanócitos, células epiteliais responsáveis por produzir pigmentos (DOMINGUES *et al.*, 2018). O melanoma representa a forma mais agressiva do câncer de pele, afetando principalmente indivíduos caucasianos de ambos os sexos (DOMINGUES *et al.*, 2018). Dependendo da sua localização, estágio e perfil genético, as opções terapêuticas variam como a ressecção cirúrgica, quimioterapia, radioterapia e a imunoterapia (DOMINGUES *et al.*, 2018).

O melanoma pode ser classificado de várias maneiras, levando em conta diversas características, como histopatologia, crescimento vertical, invasão para os linfonodos, dentre outros (ARRAGOIZ *et al.*, 2016). Quanto ao perfil histopatológico, os melanomas são classificados com base em sua variabilidade morfológica. Atualmente existem quatro padrões morfológicos descritos: espalhamento superficial, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno e melanoma lentiginoso acral (ARRAGOIZ *et al.*, 2016). O melanoma de

espalhamento superficial é o mais comum, abrangendo cerca de 75% de todos os melanomas malignos. Possui um padrão de crescimento radial por um período de tempo até que o crescimento vertical aconteça (ARRAGOIZ *et al.*, 2016). O melanoma do tipo nodular se caracteriza principalmente pela falta de crescimento radial ao redor da fase de crescimento vertical, e representa 15 a 30% dos tipos de melanoma. O melanoma maligno lentigo é responsável por 4 - 15% dos casos de melanoma. Ele geralmente cresce em áreas de pele danificadas em indivíduos com mais de 65 anos de idade e surge em áreas da cabeça e pescoço que são mais expostas aos raios solares. O melanoma acral é o menos comum, porém muitas vezes são grandes medindo aproximadamente 3 cm de diâmetro médio (ARRAGOIZ *et al.*, 2016).

Na gênese do melanoma devido à regulação negativa principalmente de moléculas de adesão como as caderinas, as células do melanoma assumem o controle da epiderme gerando a formação de um microambiente tumoral. Além disso, ocorrem alterações estruturais na motilidade destas células aumentando seu potencial maligno, sendo um processo que ocorre em cinco etapas definidas em termos clínicos e histopatológicos (GURZU *et al.*, 2018; CORICOVAC *et al.*, 2018 CLARK *et al.*, 1984). Inicialmente, uma população clonal de melanócitos que foi transformada começa e se multiplicar. No segundo estágio ocorre o crescimento radial confinado a epiderme. No terceiro estágio, durante o crescimento radial, as células adquirem a capacidade de proliferar intraepidêrmicamente. No quarto estágio as lesões que progrediram para a fase de crescimento vertical têm a capacidade de invadir a

derme e formar uma massa expansível. No quinto e último estágio ocorre à disseminação das células para outras partes da pele ou outros órgãos ocasionando o evento de metástase (**Figura 4**) (CLARK *et al.*, 1984; MILLER *et al.*, 2006).

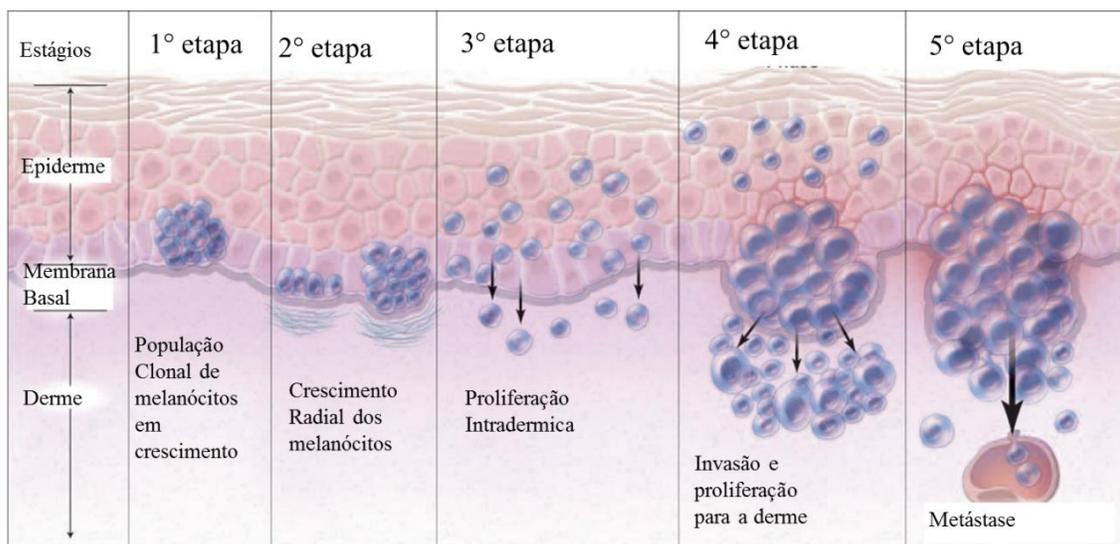


Figura 4: Etapas de evolução do melanoma. O esquema representa o estágio de evolução a partir de uma população de melanócitos que sofreu mutação, nos dois primeiros estágios nos temos o crescimento desordenado destas células e o confinamento na epiderme, a partir do terceiro estágio os melanócitos mutados começam a migrar para a derme onde começa e a proliferar onde atinge a corrente sanguínea e se desloca para outros órgãos e tecidos (adaptado de MILLER, 2006).

1.1.2 – Epidemiologia e tratamento do melanoma

Segundo dados da WHO em 2020, entre 2 e 3 milhões de cânceres de pele não-melanoma e 132.000 cânceres de pele do tipo melanoma ocorrem globalmente a cada ano. Importante ressaltar que um em cada três tipos de câncer diagnosticados é um câncer de pele (WHO, 2020). Para o Brasil, o último levantamento feito pelo INCA, também em 2020, o número de novos casos de câncer de pele não-melanoma esperado para o biênio 2020-2022

será de 176.930. Isto representa um aumento de 6.85% em relação ao biênio 2018/2019. Em relação ao câncer de pele melanoma, o número de casos estimados para 2020 é de 8.450 sendo 4.200 novos casos em homens e 4.250 novos casos em mulheres. Estes números representam um aumento de 43% e 27,2% para homens e mulheres, respectivamente, em relação ao biênio 2018/2019. Além disso, o número de mortes no ano de 2019 foi de 1.978, sendo 1.159 homens e 819 mulheres.

Devido a sua complexidade, o tratamento para o melanoma se torna um desafio, apesar de existirem diversos tipos de tratamento para o mesmo (DOMINGUES *et al.*, 2018). A cirurgia ainda é o tratamento mais indicado para alguns casos de melanoma. Já a quimioterapia e a radioterapia podem ser utilizadas dependendo do estágio do câncer (INCA, 2019). Esses métodos não são completamente eficazes, sendo um desafio atualmente à busca por novos alvos terapêuticos. Muitos estudos estão sendo realizados buscando atingir vias importantes para o desenvolvimento do melanoma, tais como:

- inibição da via de sinalização de MAPK (do inglês *mitogen activated protein kinases*), que é uma via importante para o processo de proliferação celular, buscando-se inibidores que diminuam o processo de proliferação celular. Um exemplo é o trametinibe, um dos primeiros inibidores de MAPK descobertos (GRIMALDI *et al.*, 2017; YAMAGUCHI *et al.*, 2011)
- inibidores do gene *BRAF*. Este gene codifica um serina-treonina quinase e sabe-se que mutações em *BRAF* estão presentes em 40-70% dos melanomas levando a um aumento da proliferação celular (MAVERAKIS *et al.*, 2015).

Além disso, outro tipo de tratamento que muito utilizado para o melanoma é a imunoterapia principalmente na utilização e o desenvolvimento de anticorpos monoclonais em pontos de controle imunológico CTLA-4 e PD-1, pois estes resultaram em resposta antitumorais altas, comprometendo todo o desenvolvimento tumoral no organismos. (GARBE *et al.*, 2011; ESFAHANI *et. al*, 2020). Além desta, há também a reprogramação de células imunes encontradas no microambiente tumoral (REDMAN *et al.*, 2016; FRANKLIN, *et al.*, 2017). Todas estas terapias buscam uma menor toxicidade e minimizar a resistência da doença ao tratamento.

1.2 – Metabolismo da célula tumoral

Já está bem descrito na literatura que, em células em proliferação e nos tumores, a taxa de captação de glicose aumenta drasticamente, ocasionando um aumento na produção de lactato, mesmo na presença de oxigênio e com mitocôndrias funcionais. Esse mecanismo hoje é conhecido como glicólise aeróbica ou Efeito Warburg (LIBERTI & LOCASALE, 2016).

Em 1925, Otto Warburg observou que células tumorais consumiam enormes quantidades de glicose que era fermentada para produzir lactato mesmo na presença de oxigênio, recebendo o nome de glicólise aeróbica. Observou-se que a taxa da glicólise aeróbica é maior em células tumorais e a produção de lactato é 100 vezes maior do que em células normais (SHESTOV *et al.*, 2014; LOCASALE & CANTLEY, 2011).

Posteriormente, foi observado que no microambiente tumoral, as células tumorais sofrem competição com outros tipos celulares como macrófagos e células do estroma principalmente competido por metabólitos presentes no micrambiente como a glicose

(CHANG *et al.*, 2015). Um estudo realizado por EPSTEIN *et al.*, (2014), demonstrou que quando ocorrem mudanças no ambiente em que necessitava uma maior quantidade de ATP, a glicólise aeróbica aumentava, ao passo que a fosforilação oxidativa permanecia constante. Assim, o Efeito Warburg é um processo de adaptação utilizado pela célula tumoral para suportar a demanda energética da proliferação descontrolada. Dessa forma, o aumento do consumo de glicose é usado como fonte para processos anabólicos para apoiar esta proliferação (BOROUGHES & DeBERARDINIS, 2015), assim ajudando na síntese de lipídeos, nucleotídeos e proteínas importantes.

Estudos têm mostrado a importância do Efeito Warburg não só na rápida geração de energia para a célula tumoral, como também na sinalização entre as células tumorais (WELLEN & THOMPSON, 2012). Esta afirmação sugere que o metabolismo alterado da célula tumoral favorece a tumorigênese, contribuindo para o desenvolvimento tumoral no organismo. Assim o metabolismo e a sinalização celular não seriam componentes separados, mas sim integrados, permitindo que as células tumorais modulem atividades como sobrevivência e proliferação com base em seus recursos metabólicos (Figura 5) (WELLEN & THOMPSON, 2012).

Um aspecto da integração entre o metabolismo e a sinalização da célula tumoral está relacionado ao ambiente de hipóxia (baixos níveis de oxigênio) encontrado em muitos tumores sólidos. Esta condição é encontrada em diversos tipos de tumores e leva a uma série de mudanças que podem promover o desenvolvimento da célula tumoral (TAMEEMI *et al.*, 2019). Dentre estas mudanças estão alterações proteômicas que estão relacionadas a proteínas do ciclo celular e à apoptose (TAMEEMI *et al.*, 2019). Além disso, essas alterações podem levar ao aumento da expressão de proteínas relacionadas ao crescimento ou garantir o aporte de nutrientes através da criação de vasos sanguíneos, contribuindo para

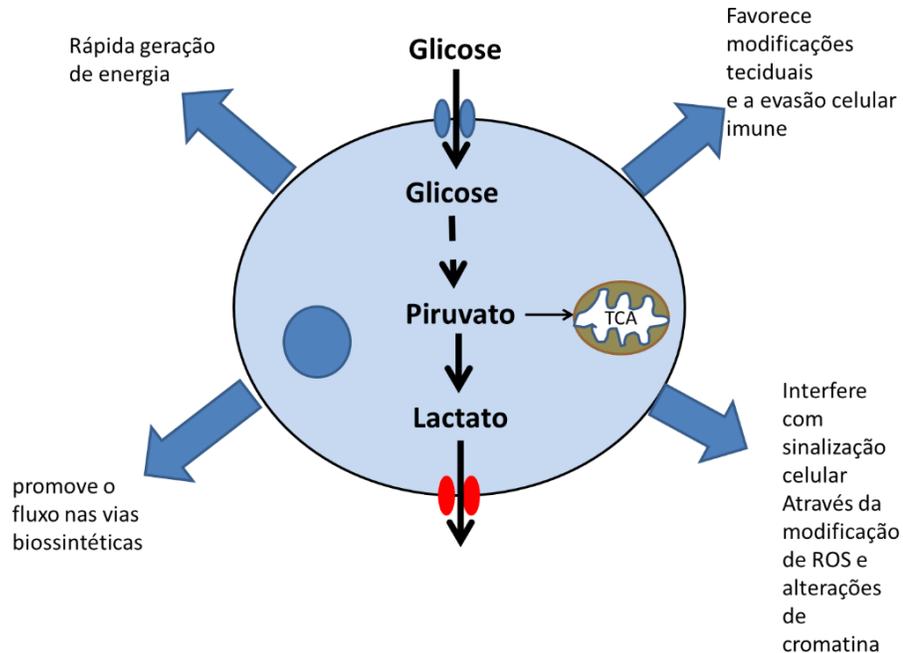


Figura 5: Esquema de mecanismo de ação do efeito Warburg em células tumorais: este fenômeno é definido como um aumento na taxa de captação de glicose e produção de lactato, mesmo na presença de oxigênio, chamado também de glicólise aeróbica, ocasionando a rápida geração de energia, dentre outras possíveis funções que esse fenômeno gera para a célula tumoral. As siglas representam Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês ROS) e o Ciclo do Ácido Cítrico (do inglês TCA) (Elaboração própria, baseada em FU *et al.*, 2017).

sobrevivência do tumor (SEO *et al.*, 2014). A hipóxia é regulada principalmente pelo fator indutor de hipóxia (do inglês *Hypoxia-inducible Factor*, HIF) um fator de transcrição cuja expressão é regulada em resposta aos baixos níveis de oxigênio, porém pode ser ativado em condições de normoxia também (WOLFF *et al.*, 2017; SHITO & REY, 2017). Em seres humanos foram descritos três isoformas de HIF: HIF-1 α , HIF-2 α e HIF-3 α . A isoforma HIF-1 α é superexpressa em tumores, onde a sua transcrição não requer oxigênio, mas em condições de normóxia ela é rapidamente degradada (CAVADAS *et al.*, 2013).

Existe uma ampla diversidade de genes que são superexpressos em tumores induzidos por HIF-1 α , como os transportadores de glicose, fatores de crescimento semelhantes a insulina e proteínas relacionadas ao processo de neovascularização como fator de crescimento vascular endotelial (do inglês VEGF), para garantir o aporte de nutrientes (MASOUD & LI, 2015). Neste contexto, foi observado que, em células tumorais, o HIF-1 α , está relacionado com a superexpressão e aumento de atividade de diversas enzimas da glicólise como a lactato desidrogenase (LDH), as hexoquinases (HK) 1 e 2, e a isoforma L da fosfofrutoquinase (PFK). Além disso, HIF-1 α pode regular genes ligados ao transporte de glicose, como de GLUT-1 (GIATROMANOLAKI *et al.*, 2016; SEMENZA, 2010) contribuindo, globalmente, para a manutenção do perfil glicolítico tumoral em ambiente de hipóxia. Assim o metabolismo da célula tumoral não está relacionado somente com a rápida geração de energia, mas também influencia diversos aspectos que auxiliam no crescimento e na manutenção do tumor no organismo, garantindo sua sobrevivência (KOPPENOL, *et al.*, 2011). Por meio do Efeito Warburg averiguou-se que a célula tumoral aumento sua produção de lactato (PARKS *et al.*, 2019).

O lactato pode existir na forma de dois isômeros, D-lactato e o L-lactato, sendo o último o fisiologicamente predominante. Em condições fisiológicas normais, o lactato pode ser utilizado como fonte de energia e pode ser convertido, no fígado, em glicose por meio do Ciclo de Cori (TALASNIEMI *et al.*, 2008; GLADDEN, 2004). A conversão do piruvato a lactato é feita pela enzima lactato desidrogenase (do inglês *Lactate Dehydrogenase*, LDH) que possui duas isoformas a LDHA e a LDHB. A primeira é a isoforma predominante encontrada no músculo esquelético e fígado. Já a segunda isoforma é encontrada no

músculo cardíaco, rins, eritrócitos e é responsável por converter o piruvato em lactato para a geração de energia (ANDANY, *et al.*, 2014; LÓPEZ *et al.*, 2019).

O lactato é importante para a célula tumoral, pois age como molécula de sinalização celular, substrato para a geração de energia e como supressor imunológico. As células tumorais e os fibroblastos associados ao tumor são as principais produtoras de lactato no microambiente tumoral devido a sua abundância. O lactato é um dos principais produtos liberados pelo tumor sendo um parâmetro comum para a análise metabólica de diversos tipos tumorais (LUC *et al.*, 2015).

Foi observado que o microambiente tumoral apresenta um pH ácido em torno de 6-6,5 o que está associado à metástase, à angiogênese (como observado pelo aumento da expressão de VEGF) e à resistência a terapia (PARKS *et al.*, 2019). Essa acidificação é uma consequência da alta produção de lactato e é uma característica de tumores mais agressivos (CAÑÁVERAS *et al.*, 2019; IPPOLITO *et al.*, 2019).

SATTLER *et al.*, (2010) relatam uma maior resistência ao tratamento em células tumorais com alto teor de lactato. Além disso, algumas abordagens terapêuticas têm sido utilizadas para diminuir ou interferir na produção de lactato pela célula tumoral. Uma das abordagens envolve a utilização de RNA de interferência (siRNA) para diminuir a expressão da enzima LDHA (LE *et al.*, 2010). Outras terapias utilizadas envolvem a utilização de compostos que bloqueiam os transportadores de monocarboxilatos (do inglês *Monocarboxylate transporters*, MCT), que são proteínas transmembranares responsáveis pelo transporte de produtos endógenos e exógenos, sendo o MCT 1 e 4 responsáveis pelo transporte de lactato (LÓPEZ *et al.*, 2019).

Além destes, diversas vias de sinalização celular, bem como os diversos componentes destas vias importantes para a manutenção do fenótipo glicolítico da célula tumoral, têm sido considerados alvos terapêuticos para diminuir a produção de lactato e, conseqüentemente, retardar a progressão tumoral (BENSINGER & CHRISTOFK, 2012).

1.2.2 – Vias importantes para o desenvolvimento e manutenção do perfil metabólico tumoral

1.2.2.1 – Via PI3K/AKT/mTOR e sua importância na tumorigênese

A proliferação, sobrevivência e motilidade das células tumorais estão reguladas por uma série de vias intracelulares. Entre elas está a PI3K/AKT/mTOR, uma das principais vias de regulação do metabolismo e proliferação celular, cuja importância na tumorigênese já é bem estabelecida (HOXHAIJ & MANNING, 2019). Essa via é ativada em resposta à insulina e hormônios de crescimento, regulando diversos eventos como metabolismo de glicose, síntese de macromoléculas, dentre outros (HOXHAIJ & MANNING, 2019). A fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), engloba uma família de proteínas quinases que tem como característica a função de fosforilar o anel 3'-OH do fosfolípido inositol. As PI3Ks de classe I são heterodímeros compostos por uma subunidade catalítica p110 e uma subunidade reguladora p85 (PORTA *et al.*, 2014). Existem duas classes de PI3K, a classe IA ativada por receptores tirosina quinases (PI3K α , β e δ), e a classe IB (PI3K γ) ativadas por receptores acopladas a proteínas G (PORTA *et al.*, 2014). Quando ocorre a ativação de receptores de

tirosina quinase pela sinalização de fatores de crescimento, resíduos de tirosina destes receptores são autofosforilados, e a PI3K é recrutada para a membrana onde acontece a sua ligação a fosfotirosina, levando a ativação alostérica da subunidade catalítica (PORTA *et al.*, 2014). A ativação de PI3K leva a produção de um segundo mensageiro, o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃), a partir de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) (PORTA *et al.*, 2014). A seguir, o acúmulo de PIP₃ recruta proteínas efetoras, uma dessas classes é a proteína serina-treonina quinase AKT também conhecida como proteína quinase B (**Figura 6**) (PKB). A ativação de AKT fosforila uma ampla diversidade de substratos, influenciando uma diversidade de eventos biológicos, como proliferação e sobrevivência celular (ANNING & TOKER, 2017; FRUMAN *et al.*, 2018).

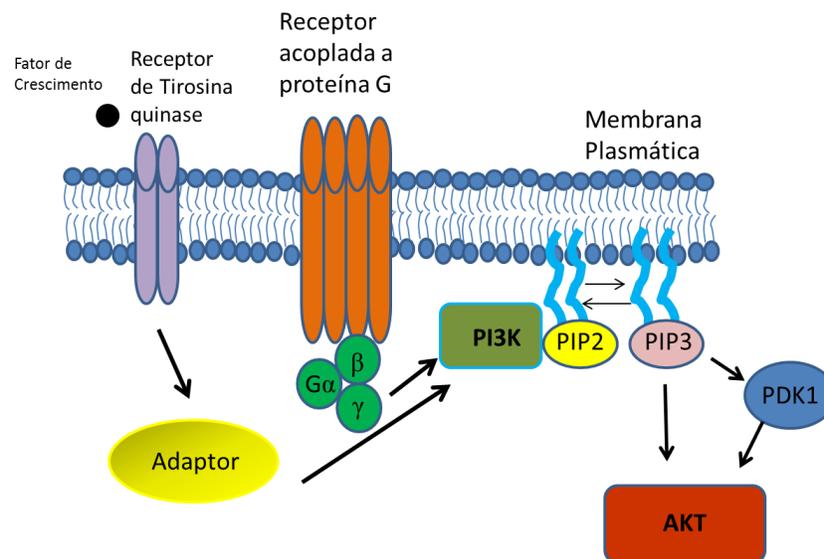


Figura 6: Via de ativação de PI3K/AKT: A sinalização de fatores de crescimento leva a estimulação de receptores tirosina quinases e receptores acoplados a proteína G, dessa forma ocorre a ativação de PI3K, levantando a formação do segundo mensageiro fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃), levando ao recrutamento de AKT e sua ativação (Elaboração própria, baseada em SHI *et al.*, 2019).

A sinalização de AKT é importante para a regulação do metabolismo celular, pois esta altera o metabolismo controlando fatores de transcrição que regulam a expressão de proteínas ligadas ao metabolismo. A AKT também ativa efetores importantes, como o alvo de rapamicina em mamíferos (do inglês *Mammalian Target of Rapamycin*, mTOR) (**Figura 7**).

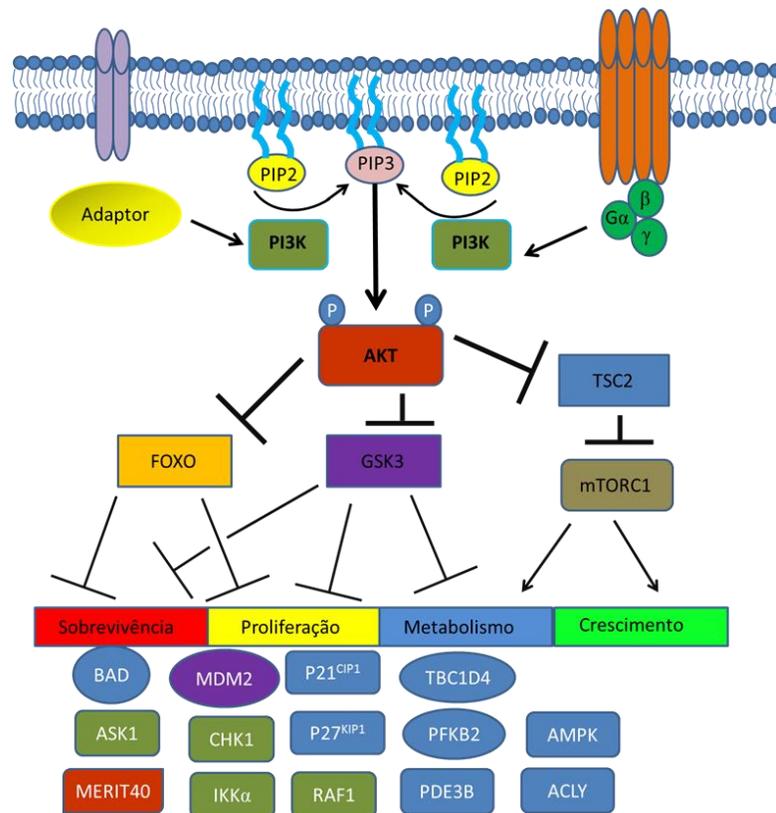


Figura 7: Rede de sinalização de AKT. AKT fosforila substratos importantes para a regulação de diversos eventos celulares, incluindo substratos multifuncionais. Eventos como a proliferação, crescimento e o metabolismo são regulados pela ativação de AKT (Elaboração própria baseada em XU et al., 2020).

A mTOR existe na forma de dois complexos multiprotéicos com funções e composições distintas mTORC1 e mTORC2, mas ambos são ativados por PI3K/AKT

(HOXHAIJ & MANNING, 2019). O complexo mTORC1 é formado por três componentes: mLST8, PRAS40 e Raptor, ele é responsável pela ativação de S6K, levando à tradução de proteínas e crescimento celular (MEMMOTT & DENNIS, 2009). O complexo mTORC2 é formado por Sin1, Rictor e mLST8; seu papel na função celular e na tumorigênese ainda não é bem esclarecido, contudo foi visto que ele é responsável por ativar AKT (PORTA *et al.*, 2014) (**Figura 8**).

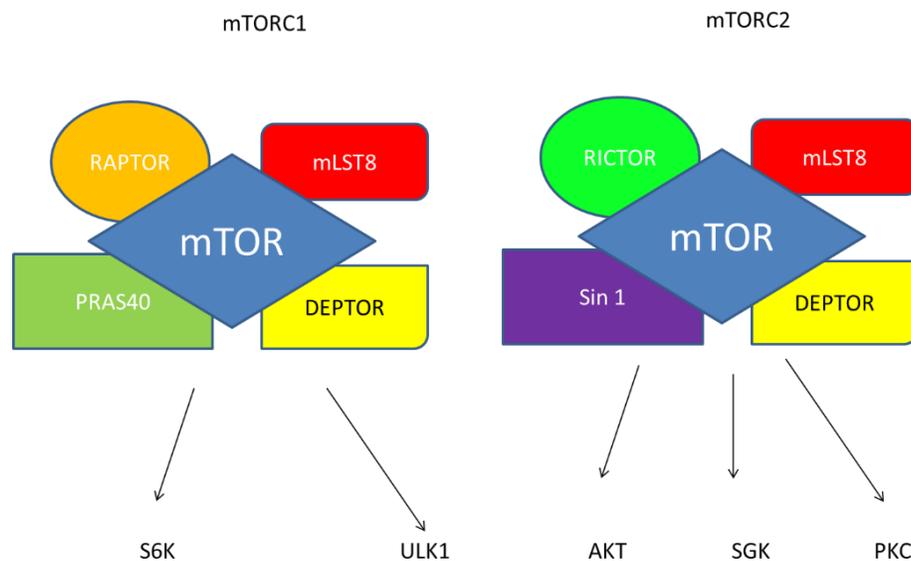


Figura 8: Visão geral dos complexos mTORC1 e mTORC2: observa-se os principais substratos ativados por cada um dos complexos, muitos deles estão envolvidos no crescimento e no metabolismo celular. Vale observar que o complexo mTORC2 ativa AKT, mantendo a via de sinalização ativa (Elaboração própria, baseada em YOON & CHOI, 2016).

A via PI3K/AKT/mTOR é uma das vias mais importantes para o estudo da bioquímica do câncer principalmente por estar relacionada a manutenção do fenótipo glicolítico mencionado anteriormente (HOXHAIJ & MANNING, 2019). De fato, a ativação constitutiva de AKT demonstrou ser suficiente para promover a glicólise aeróbica, enquanto a

superexpressão de AKT, encontrada em tumores, auxilia na manutenção do perfil glicolítico (ANCEY *et al.*, 2018). A AKT também é responsável pela regulação do translocamento de GLUT-1 para membrana em células tumorais (ANCEY *et al.*, 2018).

Além de atuar na regulação da captação de glicose, foi visto que a ativação de AKT promove um aumento da atividade de hexoquinase 2 (HK2), uma enzima importante na glicólise. (NEARY & PASTORINO, 2013). A expressão de HK2 está aumentada em diversos tipos de tumores, como o de ovário, colorretal, pâncreas e fígado. Estudos mostraram que a superexpressão de HK2 está associada com um pior prognóstico (LIU *et al.*, 2016).

Por conta das diversas vias de atuação e regulação descritas acima para o desenvolvimento tumoral, diferentes abordagens terapêuticas têm como objetivo regular ou inibir componentes desta via, a fim de impedir o desenvolvimento do tumor.

1.3 - Macrófagos: Características

Os macrófagos são um dos tipos celulares chaves na regulação da homeostase e inflamação nos tecidos. Atuam na imunidade inata e regulam diversas células na imunidade adaptativa (AMIT *et al.*, 2017). Além disso, os macrófagos desempenham funções importantes nos tecidos onde eles residem como, por exemplo, os macrófagos encontrados nos alvéolos que tem a função de renovar o surfactante pulmonar (HOEKSEMA & GLASS, 2019; AMIT *et al.*, 2017). Dessa forma, a desregulação das atividades dos macrófagos

contribui para a grande diversidade de doenças humanas, dentre elas as inflamatórias e as metabólicas (HOEKSEMA & GLASS, 2019; GAUTIER *et al.*, 2012).

Os macrófagos presentes em mamíferos são provenientes de duas fontes distintas: do saco vitelino e dos monócitos (KLOC *et al.*, 2019). Em camundongos, durante o período de gestação, o saco vitelino produz um conjunto de células progenitoras chamadas de eritromielóides, que colonizam os órgãos em formação e se tornam os macrófagos residentes dos tecidos (KLOC *et al.*, 2019; GOMEZ *et al.*, 2015). Já os macrófagos originados a partir da diferenciação dos monócitos, derivam de células-tronco hematopoiéticas (do inglês Hematopoietic Stem Cell, HSC), localizadas no fígado de embriões e na medula óssea de organismos pós-embrionários (EPELMAN *et al.*, 2014).

Os macrófagos são células da imunidade inata, residindo em praticamente todos os tecidos do organismo e, ambas as linhagens, atuam como verdadeiras sentinelas. Eles são responsáveis por produzir espécies reativas de oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species*, ROS) responsáveis pelo dano microbiano, além de proteínas, como interleucinas, para o recrutamento de células como linfócitos T da imunidade adaptativa e apresentação de antígenos (KOO & GARG, 2019; GUTKNECHT & BOUTON, 2014).

Os macrófagos apresentam uma grande plasticidade fenotípica devido à diversidade de estímulos, conhecida como processo de polarização (MURRAY, 2017). Classicamente os macrófagos foram denominados em dois tipos mediante o estímulo para a sua polarização: os M1 eram chamados de pró-inflamatórios, e os M2 chamados de anti-inflamatórios. Os macrófagos M1 são responsáveis por recrutar outros tipos de células, como os linfócitos T, ou seja, são responsáveis pelo combate ao antígeno, tendo sido estudados por estimulação *in*

vitro com lipopolissacarídeos (LPS) e interferon γ (IFN- γ). Já os macrófagos do tipo M2 são o subtipo responsável pela regulação do processo inflamatório, são estimulados por IL-4 regulando a produção de citocinas, eliminando corpos apoptóticos. Além disso, eles estimulam a produção de poliaminas e prolina para induzir a proliferação e produção de colágeno, importante para a cicatrização de feridas e para o reparo tecidual (**Figura 9**) (KOO & GARG, 2019; MINUTTI *et al.*, 2016).

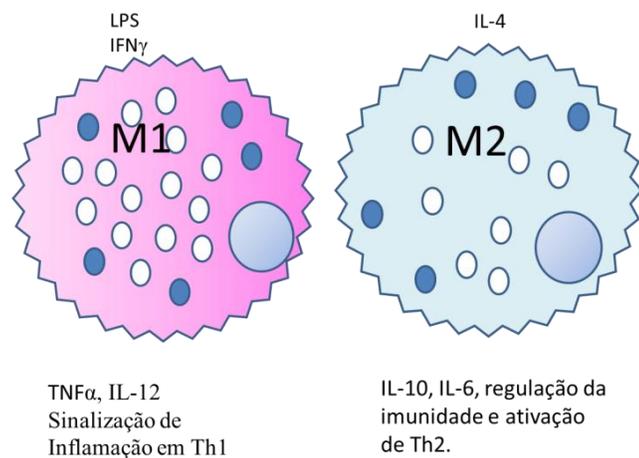


Figura 9: Polarização de macrófagos: Estímulos diferentes, ocasionam diferentes perfis de polarização em macrófagos. O perfil M1 é induzido por LPS/IFN- γ , e está frequentemente associado ao combate direto do patógeno. O perfil M2 é ativado mediante estímulo de IL-4 e atua na regulação do processo inflamatório secretando outras citocinas e quimiocinas que diminuem a resposta imune de outras células, ou atuam no reparo tecidual liberando fatores de crescimento (Elaboração própria).

Cabe ressaltar que a terminologia M1 e M2 é simplificada uma vez que já foi identificado que macrófagos do tipo M2 podem ser agrupados em três tipos diferentes. Adicionalmente, estudos de transcriptômica confirmaram a diversidade fenotípica dos macrófagos (Xue *et al.*, 2014), como mostrado na **Figura 10**.

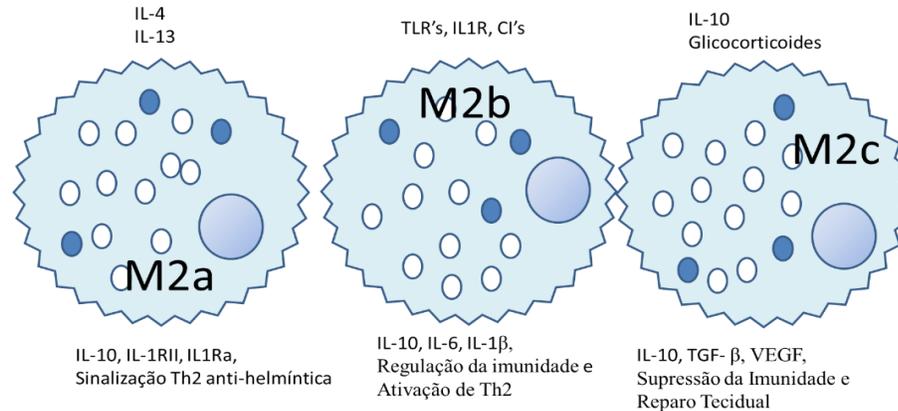


Figura 10: Subtipos de macrófagos M2: O perfil de polarização em M2 é muito diversificado apresentando três subtipos principais. O M2a é estimulado principalmente por IL-4 e IL-13, sendo oposto ao M1; o estado M2b é estimulado principalmente por IL-1 e complexos imunológicos (CI's). Já o estado M2c é estimulado por IL-10 e glicocorticoides e está envolvido principalmente no reparo tecidual. Na parte inferior de cada representação dos subtipos de macrófagos estão descritas as citocinas liberadas por eles (Elaboração própria).

Quando há ativação pró-inflamatória ocorre à liberação de citocinas e quimiocinas, que são proteínas de baixo peso molecular e que regulam o processo inflamatório, estabelecendo uma comunicação com outras células do sistema imune para que sejam ativadas ou migrem para o local da inflamação (BONNET & MUKHERJEE, 2019). Uma das primeiras citocinas descobertas foi o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que é responsável principalmente por provocar apoptose de células tumorais (AGGARWAL, 2003). O estímulo para a produção de TNF- α está relacionado com a via de sinalização feita pelo fator nuclear kappa β (NFk β), Janus quinase (JNK) e p38MAPK. Além disso, existe uma gama de citocinas que ampliam a resposta pró-inflamatória como é o caso das interleucinas, destacando a IL-6, IL-12 e IL-1 β (BONNET & MUKHERJEE, 2019).

A inflamação é um evento que requer resolução para que mantenha a integridade do tecido afetado, nesse caso os macrófagos desempenham um papel chave na regulação da imunossupressão em inflamação (CAI *et al.*, 2015). Quando um macrófago é ativado para um perfil imunomodulador, este libera citocinas que ativam programas anti-inflamatórios, como é o caso da IL-10, uma interleucina ativada por via Janus quinase (JNK) e transdutor de sinal e de proteínas de transcrição (do inglês STAT) e que atua principalmente no suporte a resposta imune. Outra importante citocina é a IL-10 cuja principal função é a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (CAI *et al.*, 2015; COUPER *et al.*, 2008).

1.4 – Sistema Imune e Câncer

Como já mencionado em tópico anterior, para que haja o desenvolvimento do tumor, existe uma série de eventos e mecanismo importantes. Em 2011, HANAHAN e WEINBERG, destacaram um compilado dos principais mecanismos e eventos utilizados pela célula tumoral para que esta consiga se desenvolver no organismo como mostra a **Figura 11**. Segundo esses autores, um dos eventos que vem ganhando destaque atualmente é a relação entre o sistema imunológico e o desenvolvimento e progressão tumoral. Teoricamente, no organismo, ocorre a chamada vigilância imune: onde todas as células, tecidos e órgãos são vigiados constantemente pelo sistema imunológico (principalmente pelos macrófagos), de maneira que células que possam se desenvolver em tumores sejam eliminadas (HANAHAN & WEINBERG, 2011). Entretanto, diversos tipos de tumores adquirem uma capacidade de

se evadir do sistema imune, ou são capazes de limitar a resposta das diversas células de defesa e garantir seu desenvolvimento (HANAHAN & WEINBERG, 2011).



Figura 11: Os hallmarks do câncer. Esta figura mostra os principais eventos e mecanismos que estão associados ao desenvolvimento e progressão da célula tumoral (adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Em camundongos geneticamente modificados para apresentarem deficiência em componentes do sistema imune (tais como macrófagos), observou-se que os tumores surgiram com maior frequência ou se desenvolveram mais rapidamente do que em camundongos não modificados (HANAHAN & WEINBERG, 2011). Este resultado foi ainda mais significativo em camundongos deficientes para linfócitos T CD8+ e linfócitos T auxiliares CD4+ e células natural killer (NK). Além disso, camundongos que tiveram deficiência tanto para linfócitos T quanto para NKs foram mais suscetíveis ao desenvolvimento de um tumor. Estes dados indicam que tanto a imunidade inata quanto a

adaptativa participam do processo para erradicar ou interferir com o desenvolvimento tumoral (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Células tumorais podem evitar sua eliminação, evadindo ou modificando células imunes presentes no microambiente tumoral que deveriam eliminá-las. Um exemplo dessa relação é que células tumorais podem interferir com a infiltração e ativação de linfócitos T citotóxicos e NKs, secretando TGF- β e outros imunossupressores (YANG *et al.*, 2010). Além disso, também são capazes de liberar diversos fatores que podem recrutar células como os linfócitos T reguladores, reprimindo a resposta imunológica antitumoral (YANG *et al.*, 2010; MOUGIAKAKOS *et al.*, 2010). Dessa forma, é importante investigar os parâmetros que podem estar relacionados entre a progressão tumoral e o papel que o sistema imunológico desempenha, bem como quanto a interferência do tumor nas atividades imunológicas.

1.4.1 – Polarização de macrófagos e o desenvolvimento tumoral

O metabolismo celular dos macrófagos regula eventos como a polarização e a resposta antitumoral. A atividade fagocítica dos macrófagos elimina células mortas e remove resíduos celulares (MEHLA & SINGH, 2019). Contudo, no microambiente tumoral os macrófagos sofrem um processo de reprogramação metabólica para evitar que estes desencadeiem o processo de inflamação e de morte de células tumorais (MEHLA & SINGH, 2019). Embora os macrófagos associados ao tumor (do inglês *Tumor-associated Macrophages*, TAM) não sigam completamente a polarização em M1 e M2, eles são

polarizados para um perfil semelhante ao M2 contribuindo para o crescimento e desenvolvimento do tumor (MEHLA & SINGH, 2019).

Existem diversos fatores responsáveis pela polarização de macrófagos no microambiente tumoral. Um deles está relacionado ao lactato liberado pelas células tumorais, que induz a polarização dos macrófagos residentes nos tumores para um perfil semelhante ao M2, ou seja, TAM (Figura 12) (MEHLA & SINGH, 2019; COLEGIO *et al.*, 2014). O lactato, fruto da glicólise aeróbica, não só contribui para o crescimento e a metástase da célula tumoral, mas também atua como um imunossupressor (MEHLA & SINGH, 2019; COLEGIO *et al.*, 2014).

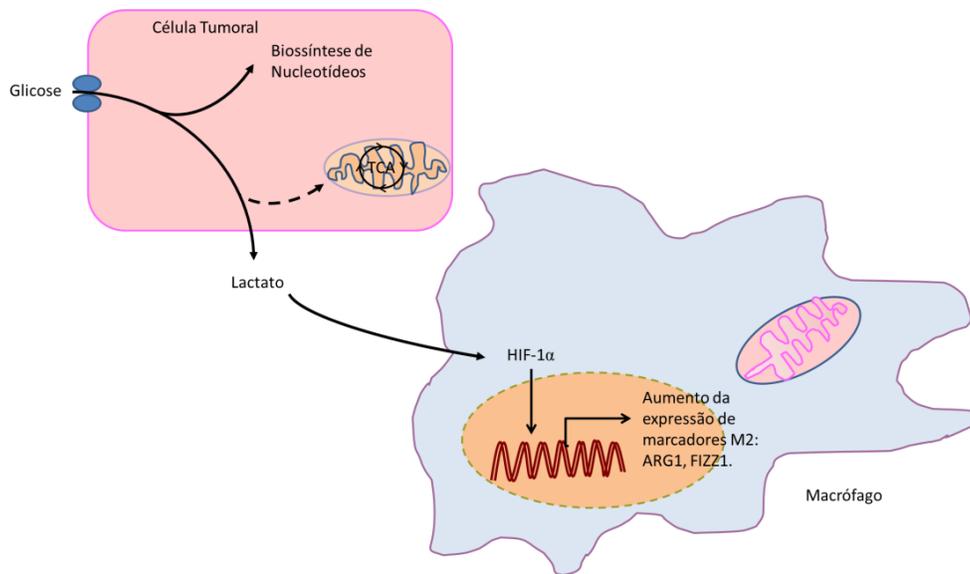


Figura 12: Polarização de macrófagos no microambiente tumoral: O lactato proveniente do metabolismo da célula tumoral sinaliza em células de macrófagos presentes no tecido para a polarização em um perfil semelhante ao M2 (Elaboração própria, baseada em COLEGIO, 2016).

O lactato liberado pela célula tumoral estimula a expressão de marcadores de polarização de macrófagos em M2, incluindo: *Arg1*, *Fizz1*, *Mgl1* e *Mgl2* (COLEGIO, 2016; COLEGIO *et al.*, 2014). Além disso, o lactato pode estabilizar a expressão de HIF-1 α e este induzir a expressão de fatores ligados a angiogênese como o VEGF em TAMs (**Figura 13**) (COLEGIO, 2016; COLEGIO *et al.*, 2014). Dessa maneira, contribuindo para o aumento no fornecimento de nutrientes para o tumor e também para o processo de metástase.

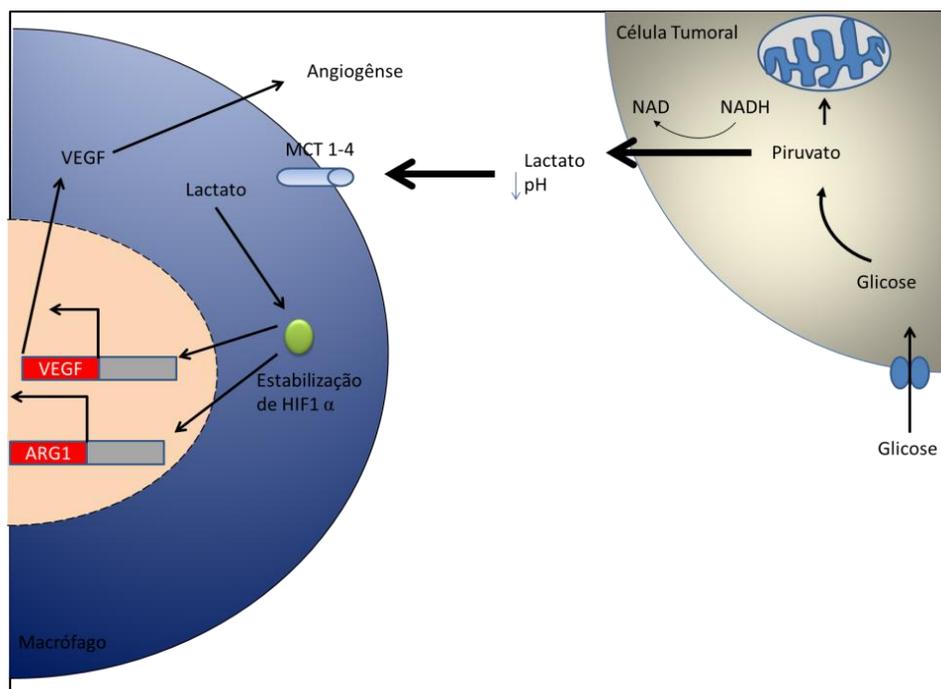


Figura 13: Sinalização parácrina que ocorre entre a célula tumoral e o macrófago associado ao tumor: Lactato liberado fruto do metabolismo da célula tumoral é sinalizado no macrófago associado ao tumor aumentando a expressão de fatores ligados a angiogênese como o VEGF, aumentando a vascularização e o aporte de nutrientes para a célula tumoral (Elaboração própria baseada em COLEGIO, 2016).

Os TAMs têm um importante papel na manutenção do desenvolvimento da célula tumoral, não só ao garantir o aporte de nutrientes, mas também pela sua interação com outras células do sistema imune (**Figura 14**) (ZHENG *et al.*, 2017). Os TAMs produzem citocinas e outros fatores imunossupressores, como IL-10 e TGF- β , que inibem a resposta efetora das células T CD8⁺ e CD4⁺. Também secretam quimiocinas como CCL3, CCL4, CCL18 e CCL22 que contribuem para o recrutamento de linfócitos T reguladores diminuindo a resposta antitumoral (ZHENG *et al.*, 2017).

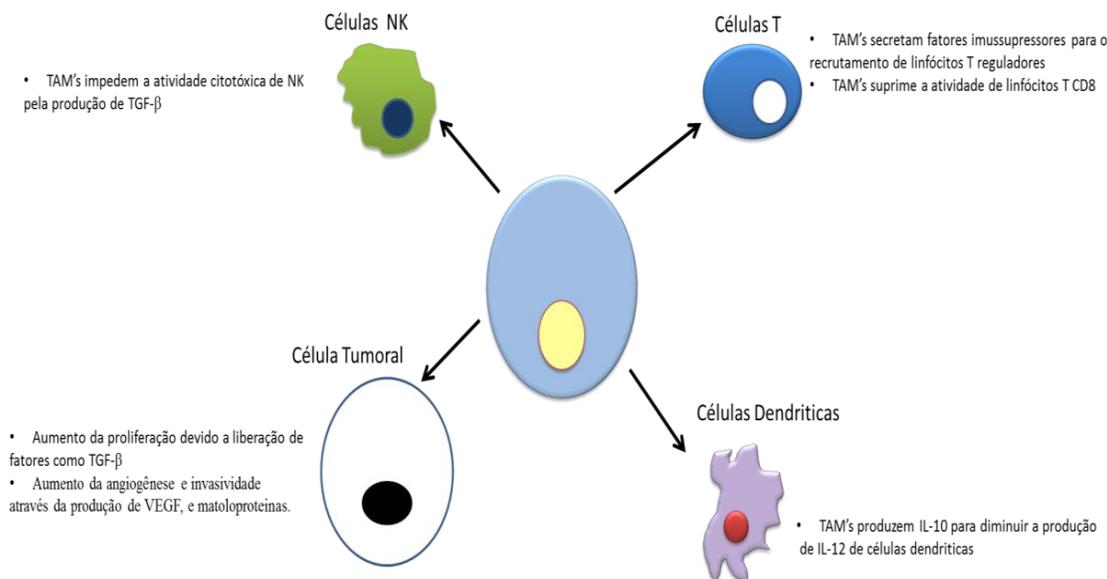


Figura 14: Influência dos macrófagos associados ao tumor em outras células presentes no microambiente tumoral: Os macrófagos associados ao tumor interagem com outros tipos celulares além da própria célula tumoral, para promover seu crescimento e invasão, além de diminuir a resposta imune no combate ao tumor, secretando principalmente citocinas e quimiocinas que atuam em linfócitos e outras células imunes presentes no microambiente fazendo que com estas células não reconheçam a célula tumoral como um agente nocivo (Elaboração própria).

Em relatos recentes observou-se que os TAMs se originam de monócitos circulantes Ly6C⁺CCR2⁺, que entram nos tecidos através das integrinas $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha L\beta 2$, os quais aderem

em vasos através de moléculas de adesão e depois se diferenciam (PATHRIA *et al.*, 2019). Foi visto em camundongos com câncer de pâncreas que os macrófagos presentes neste tecido podem se acumular por efeitos de proliferação, se mantendo independentes da medula óssea; assim os TAMs seriam apenas um recrutamento inicial (PATHRIA *et al.*, 2019; HASHIMOTO *et al.*, 2013).

Em outros estudos sobre a origem das TAMs, foi observado que os macrófagos presentes no tecido expressam um conjunto diferente de marcadores em relação aos macrófagos derivados da medula óssea (PATHRIA *et al.*, 2019). Os macrófagos presentes no tecido expressam principalmente FcRg1 (CD64), CX3CR1 e F4/80, ao passo que os macrófagos derivados de medula óssea expressam integrina $\alpha 4$, L-selectina e Ly6c (PATHRIA *et al.*, 2019; BOWMAN *et al.*, 2016). Além disso, macrófagos presentes no tecido apresentam assinaturas gênicas relacionadas a proliferação e fibrose, como demonstrado pela maior expressão de ciclinas e colágeno. Por outro lado, os macrófagos derivados da medula óssea apresentam assinaturas de genes relacionados com a reposta imune e apresentação de antígenos (PATHRIA *et al.*, 2019). Os macrófagos podem, então, se acumular no tumor por duas origens distintas.

Além da origem, foi observado que os macrófagos presentes no microambiente tumoral apresentam características metabólicas distintas, pois estas são importantes para manter o perfil de polarização (PATHRIA *et al.*, 2019). Quando um macrófago é estimulado com IL-4 adquire o perfil M2 ocorrendo o aumento da oxidação de ácidos graxos e fosforilação oxidativa, sendo essa alteração importante para manter as funções imunossupressoras dessa célula (PATHRIA *et al.*, 2019). Esse mesmo padrão de metabolismo foi observado em macrófagos presentes no microambiente tumoral,

principalmente em tumores com ao aumento de metástase e angiogênese (PATHRIA *et al.*, 2019). Entretanto, como os macrófagos derivados da medula óssea e residentes no tecido tumoral estão preenchendo o microambiente tumoral, não está claro se ambos possuem o mesmo impacto no desenvolvimento tumoral, nem se diferentes estratégias terapêuticas que modifiquem ou diminuam essas duas populações seriam tratamentos viáveis (PATHRIA *et al.*, 2019).

1.5 – CLOTRIMAZOL

Descoberto em 1969, o Clotrimazol (CTZ) está na lista dos medicamentos essenciais da WHO, como um dos medicamentos mais seguros e eficazes a ser utilizado em tratamentos de infecções por fungos. CTZ é um derivado sintético do imidazol, com atividade antifúngica e de amplo espectro. Essa substância é responsável por inibir a biossíntese de esteróis, principalmente ergosterol (CASTELLI *et al.*, 2014), um elemento importante da membrana celular de fungos, dessa maneira danificando e alterando a permeabilidade da membrana celular (PUBCHEM, 2020 & NIH, 2020).

Estruturalmente, CTZ possui um anel imidazólico ligado a uma molécula de bisfenil-(o-clorofenil)-carbinol e tem sua fórmula molecular representado por $C_{22}H_{17}ClN_2$ e peso molecular de 344,84 g/mol (**Figura 15**). Na fase sólida é encontrado na forma de cristal branco que apresenta baixa solubilidade em água, tendo uma melhor solubilidade em solventes como o DMSO (dimetilsulfóxido).

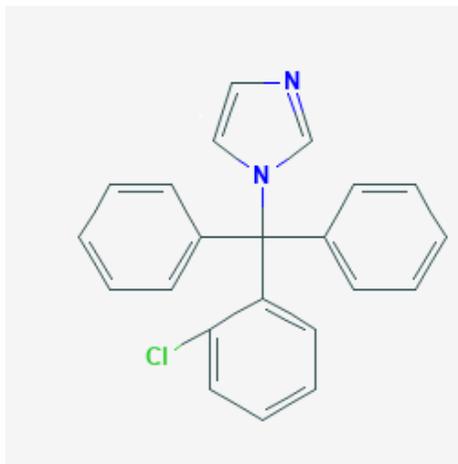


Figura 15: Forma estrutural do Clotrimazol.

1.5.1 – Clotrimazol e seu uso no tratamento como antitumoral

Os primeiros estudos realizados com o CTZ datam de 1995 e demonstraram um efeito inibitório no crescimento e proliferação de células tumorais quando este fármaco foi testado em células de melanoma e glioblastoma (BENZAQUEN *et al.*, 1995). Outros estudos mostraram que o CTZ é um potente inibidor de calmodulina levando a redução dos depósitos de cálcio em células tumorais (HEGEMANN *et al.*, 1993). Diversos outros estudos demonstraram a que este composto foi capaz de inibir a glicólise em linhagens de células tumorais como MCF-7 e MDA-MB,231 (de mama humana) e B16F10 (melanoma murino), levando a interrupção do ciclo celular e apoptose (KADAVAKOLLU *et al.*, 2014; ZANCAN *et al.*, 2007; MARCONDES *et al.*, 2010; FURTADO *et al.*, 2012).

O estudo de FURTADO *et al.*, (2012), investigou se os efeitos antineoplásicos do CTZ poderiam estar relacionados com a inibição de forma direta da via glicolítica. Para tal,

a atividade das principais enzimas da glicólise como HK, PFK e a piruvato quinase (PK) foram avaliadas em linhagens de células não tumorais (MCF10A) e de tumor de mama não metastático (MCF-7) e metastático (MDA-mb-231). Foi, então, observado uma inibição maior da atividade das enzimas nas linhagens tumorais (cerca de 90%), enquanto em células não tumorais essa inibição foi menor (apenas 46%).

Em um estudo realizado por PALCHAUDHURI *et al.*, (2008) utilizando células de melanoma metastático B16F10 tratadas com CTZ, observaram um deslocamento da HK na membrana mitocondrial exercendo um efeito antiproliferativo e inibindo a glicólise, reduzindo os níveis celulares de ATP. Contudo, uma célula tumoral possui uma complexa rede de componentes que regulam seu metabolismo de forma a garantir a sobrevivência. Foi observado que a HK não é o único alvo do CTZ. Este composto também afeta a atividade da PFK e de outras proteínas reguladoras do metabolismo (PENSO & BEITNER, 2002; ZANCAN *et al.*, 2007; MARCONDES *et al.* 2010; FURTADO *et al.*, 2012; FURTADO *et al.*, 2015; MARCONDES *et al.*, 2015). De fato, o CTZ é capaz de inibir a PI3K, uma enzima chave na regulação do metabolismo e proliferação de células tumorais (FURTADO *et al.*, 2015). Em estudos de modelagem e de docking molecular, foi demonstrado que o CTZ pode se ligar ao sítio catalítico da PI3K (de forma semelhante ao LY294002) indicando que o mesmo age como um inibidor desta quinase. Além disso, FURTADO *et al.*, (2015) utilizaram a linhagem tumoral MCF-7 e observaram que o CTZ foi capaz de inibir o processo autofágico.

A partir desses estudos é possível inferir que o CTZ é um bom candidato para o tratamento de diversos tipos de tumores, uma vez que modula componentes chaves do metabolismo celular tumoral. Assim, o composto compromete não só o crescimento do tumor como também reduzir fatores responsáveis pela manutenção da célula tumoral no organismo.

Contudo muito dos resultados desse composto foi obtido com ensaios *in vitro*, havendo ainda a necessidade de um estudo mais aprofundado utilizando um modelo *in vivo*. WANG *et al.*, (2014) trataram camundongos BALB/c com CTZ e observaram uma redução da massa tumoral nos animais tratados com este composto. Entretanto, este estudo não avaliou os efeitos descritos anteriormente, reforçando a necessidade de estudos novos e mais aprofundado desses efeitos *in vivo*. Neste sentido, nosso grupo tem demonstrado que o tratamento com clotrimazol (200 mg/kg) durante 15 dias consecutivos diminui significativamente o crescimento e o tamanho de implantes autólogos de endotélio em ratas wistar. O exame histológico indicou regressão e atrofia, sem toxicidade para os animais. Além disso, os níveis dos marcadores angiogênicos VEGF e VEGFR-2 foram significativamente reduzidos no grupo CTZ, assim como os níveis de PGE2 e TNF- α . Todos estes efeitos envolvem a interferência da sinalização ERK1/2, Akt, AMPK e PERK no tratamento com CTZ. Assim, nossos dados indicam que o CTZ promoveu uma melhora geral da endometriose devido às propriedades antiangiogênicas da droga (MACHADO *et al.*, 2018). Adicionalmente, dados recentes mostraram que o CTZ interfere na via de produção de estrogênio, diminuindo a citocromo P450 aromatase e, portanto, reduzindo os níveis séricos de estrogênio. Como consequência, o medicamento diminui o tamanho das lesões endometrióticas e, conseqüentemente, a progressão da doença (MACHADO *et al.*, 2020).

Com base nesses relatos um estudo dos efeitos do CTZ em um modelo de melanoma *in vivo*, pode mostrar resultados promissores a respeito do desensolvimento tumoral, além de interferir com o microambiente tumoral e nas células ali presentes.

2- Objetivo

2.1 - Objetivo Geral

Avaliar se o CTZ, atuando como um inibidor de PI3K em células de melanoma, poderia modular o *crosstalk* entre as células tumorais e TAMs e, assim, inibir a tumorigênese.

2.2 – Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do tratamento com CTZ na célula de melanoma murino B16F10;
- Avaliar os efeitos do CTZ sob a polarização e viabilidade de macrófagos em cultura;
- Avaliar os efeitos do CTZ na tumorigênese em modelo de melanoma em camundongos C57BL/6J;
- Propor um modelo para ação antitumoral do CTZ através de sua ação inibitória do *crosstalk* entre células tumorais e TAMs.

3- Metodologia

3.1 - Cultura de células

Foram utilizadas linhagens celulares de macrófagos de murinos (J774 e Raw 264.7) e de melanoma murino (B16F10). Estas foram mantidas em meio DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 10% de soro fetal bovino, glutamina na concentração de 0,29g/L e bicarbonato de sódio (3,7g/L) em pH=7,4 e mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C seguindo os parâmetros protocolados em nosso laboratório (Laboratório de Oncobiologia Molecular - LabOMol).

3.2 - Tratamento com CTZ

Experimentos em placas de 96 poços ambas as células, B16F10 e Raw264.7, foram plaqueadas na densidade de 8000 células/poço. Após as células atingirem a confluência de 80%, elas receberam o tratamento com o CTZ.

Para tal uma solução de CTZ foi preparada na concentração 50mM em DMSO, que foi diluída para as concentrações de: 40, 30, 20 e 10 mM. Após a diluição, cada concentração foi diluída em meio DMEM, a fim de obter as concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 µM em 24h de tratamento no caso de B16F10.

Em Raw 264.7 o tratamento foi realizado em duas etapas: primeiramente as células receberam um tratamento prévio de IL-4 (20 ng/mL) para a polarização em M2 ou com LPS (100 ng/mL)+IFN γ (20 ng/mL) para a polarização em M1. Este tratamento para polarização dos macrófagos teve a duração de 24h. Posteriormente, as células foram tratadas com CTZ nas concentrações de 4, 6, 8, 10, 12 e 20 µM.

3.3 – Experimento *in vivo*

Para o experimento *in vivo* foram utilizados camundongos C57BL/6J machos com 7-8 semanas de vida. Os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos: Controle e Tratados. Em ambos os grupos o tumor foi induzido no dorso dos animais com a injeção subcutânea de 200.000 células de B16F10 em 100µl de PBS.

Após 15 dias de injeção os tumores foram medidos com o auxílio de um paquímetro. Nos 15 dias seguintes os animais receberam o tratamento diário de óleo de amendoim (grupo controle) e 200mg/Kg de CTZ (grupo tratado diluído em óleo de amendoim) por gavagem.

Ao final do tratamento os animais foram eutanasiados e os tecidos tumorais e outros, como o fígado, foram retirados, congelados e pulverizados em nitrogênio e armazenados em -80°C para posterior análise.

O protocolo animal seguiu todas as recomendações do protocolo de ética, previamente aprovado pelo conselho de ética (Processo 01200.001568/2013-87).

3.4 - Viabilidade Celular

A viabilidade celular e atividade mitocondrial das células em cultura foram investigadas pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazólio (MOSMANN, 1983). O MTT é uma molécula que tem a capacidade de adentrar células eucarióticas viáveis. Quando no interior das mitocôndrias, ele é reduzido em formazan, que pode ser quantificado em espectrofotômetro.

Para o ensaio seguimos o protocolo já estabelecido em nosso laboratório (Laboratório de Oncobiologia Molecular - LabOMol). Primeiramente todas as placas foram centrifugadas na velocidade 1400rpm por 6min a 25°C. Então, removeu-se o meio de cultura contendo DMSO, 10 - 50µM de CTZ para a B16F10 e DMSO, 4 - 20 µM de CTZ para a Raw 264.7 após 24h de tratamento para ambas. Em cada poço foram adicionados 100µl de uma solução contendo MTT (0,5mg/ml) em meio de cultura DMEM. A seguir, as placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 3 horas ao abrigo da luz. Após 3 horas, o sobrenadante foi retirado e os cristais de formazan foram dissolvidos em 100µl de DMSO. Ao final a leitura do corante foi feita no comprimento de onda de 530nm em um leitor de microplacas VICTOR3 (Perkin-Elmer, Waltham, MA, EUA).

A viabilidade celular também foi avaliada por extrusão de azul de tripan. Neste ensaio, após o tratamento com o CTZ o meio foi removido e as células retiradas da placa com a adição de tripsina. Posteriormente, as células foram incubadas com azul de tripan e a contagem do número de células viáveis e mortas foi feita em um microscópio invertido.

3.5 – Dosagem de Lactato

Para a dosagem de lactato nós utilizamos os parâmetros estabelecidos pelo kit (Lactato Enzimático Labtest), que tem como princípio que, na presença de oxigênio, a lactato oxidase promove a oxidação do ácido láctico presente na amostra, ocorrendo a formação de piruvato e peróxido de hidrogênio. Em seguida uma reação envolvendo o peróxido de hidrogênio 4-aminoantipirina e TOOS, sob ação da peroxidase, produz uma quinoneínia.

Após o fim do tratamento com CTZ, na B16F10, nos utilizamos o sobrenadante nos poços para realizar a quantificação do lactato produzido e, posteriormente, foi feita a leitura no aparelho VICTOR3 no comprimento de onda 550nm. Além disso também foram utilizados tecidos animais pulverizados (40mg para ambos os grupos) os quais foram lisados em tampão RIPA, centrifugados a 8000g por 10min e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação do lactato presente no tecido tumoral.

3.6 – Captação de Glicose

Para o ensaio de captação de glicose foi utilizada a glicose marcada com fluoróforo (2-NBD Glucose) diluída em DMSO, numa concentração de 100mM. Células B16F10 foram cultivadas em placas de 96 até atingirem 80% de confluência. Em seguida, o meio de cultura foi substituído por meio DMEM contendo o tratamento com CTZ e a glicose marcada na concentração de 25 μ M durante 24h. Foi utilizado, neste ensaio, o tratamento com 20 μ M de Citocalasina B que é um inibidor do transportador de glicose (GLUT-4) na célula como controle positivo.

No final do tratamento, o meio foi retirado as células foram soltas pela ação da tripsina e centrifugadas a 1500 rpm por 5min. O *pellet* de células foi ressuspenso em 400 μ l de PBS e a análise da marcação com o fluoróforo foi realizado por citometria de fluxo.

3.7 – Atividade Enzimática

As células B16F10 foram cultivadas em placas de 24 poços na densidade de 20.000/poço e receberam o tratamento com CTZ durante 24h. Posteriormente, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em tampão fosfato de potássio (10mM, pH=7,4), e lisadas em nitrogênio líquido.

A atividade enzimática foi medida pelo método descrito por SPITZ *et al.*, (2009) e ZANCAN *et al.*, (2010). Nos quais a atividade de cada enzima seguiu as especificações de cada meio de reação (**Tabela 1**), a atividade foi determinada por espectrofotometria com base na oxidação/ redução de NADPH/NAD⁺ e NADPH/NADP⁺ acompanhada pelo aumento ou decréscimo de absorvância em 340nm.

Tabela 1: Meios de Reação Atividade Enzimática

Hexokinase Reagentes	Concentração
Tris HCl pH=8.2	100 mM
MgCl ₂	2 mM
Glicose	1M
ATP	1mM
NAD ⁺	1mM
Glicose 6-fosfato desidrogenase	2 mU/ml
H ₂ O (Volume final)	2,585 ml
Fosfofrutoquinase	Concentração
Tris HCl pH=8.2	50 mM

MgCl ₂	10 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	100 mM
ATP	1 mM
Frutose 6-fostato	1 mM
NADH	1 mM
Coquetel de enzimas (Aldolase, Triose fosfato isomerase e α -glicerofosfato desidrogenase)	2 mU/mL, 2 mU/mL, 2 mU/mL respenctivamente
H ₂ O (Volume final)	2,412 ml
Piruvato quinase	Concentração
Tris HCl pH=8.2	100 mM
MgCl ₂	10 mM
KCl	120 mM
ADP	5 mM
Fosfoenolpiruvato	5 mM
NADH	1 mM
LDH	22 mU/ml
H ₂ O (Volume Final)	2,018 ml
Glicose 6-fosfato desidrogenase	Concentração
Tris HCl pH=8.2	100 mM
MgCl ₂	5 mM
NADP ⁺	2 mM
Glicose 6-fosfato	1 mM
H ₂ O (Volume Final)	2,655 ml

3.8 – Avaliação da polarização de macrófagos

Para a avaliação do perfil de polarização de macrófagos, primeiramente utilizamos o tratamento por meio condicionado. Este consiste cultivar a célula B16F10 em meio DMEM, sem soro durante 48 h ou 72 h (**Figura 16**). Ao final do tempo de cultura, o meio foi coletado, centrifugado e armazenado em freezer -80°C para análises posteriores. A produção de lactato foi avaliada pelo kit para lactato enzimático Labtest.

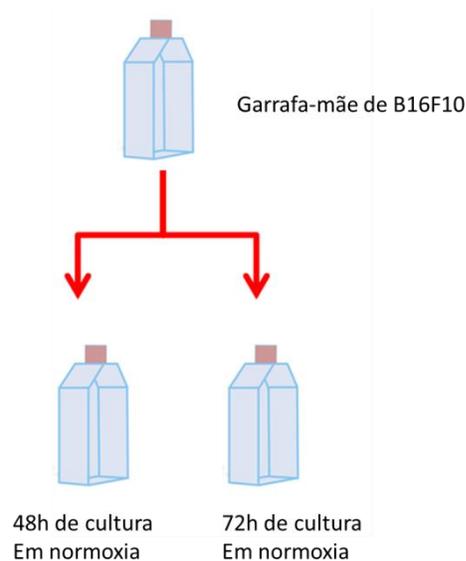


Figura 16: Método de preparo dos meios condicionados: Foi utilizada uma garrafa de B16F10 e esta foi replicada para 2 garrafas cultivadas por 48h ou 72h em normoxia.

Para o ensaio de polarização de macrófagos, o meio condicionado de B16F10 foi adicionado a placas de 6 poços contendo as células de macrófagos Raw264.7 e J774, plaqueadas na densidade de 500.000 células por poço em meio DMEM sem soro. O RNA mensageiro das células de macrófagos foi extraído ao final de 24h de tratamento com os meios condicionados; a concentração do RNA total obtido foi determinada pelo espectrofotômetro (PICOPET01, Picodrop Technologies) e sua integridade foi observada

pelas razões 280/260nm e 260/230 nm. O RNA extraído foi reversamente transcrito utilizando o kit ReverAid First Strand cDNA Synthesis em 10 µl de mistura contendo primer randômico.

Macrófagos também foram tratados com lactato 10-30mM, IL-4 (20 ng/ml) ou LPS (100 ng/ml) e IFN γ (20 ng/ml) por 24h. Para o tratamento com CTZ em células já polarizadas, o meio foi substituído por meio fresco contendo os compostos nas condições indicadas nas figuras. Para o tratamento dos macrófagos derivados de medula óssea (do inglês *Bone Marrow derived Macrophages*, BMDM), após 24h em que as células foram semeadas em placas de 6 poços utilizando o meio de cultura RPMI, as células receberam os seguintes: IL-4 (10 ng/ml), LPS (100 ng/ml) + IFN γ (20 ng/ml), Lactato (30 mM) e/ou CTZ (10 µM). Ao final do tratamento, o meio foi retirado e armazenado em freezer -80°C para análises posteriores, assim como as células remanescentes.

Para análise dos macrófagos presentes nos tecidos tumorais, 50mg dos tecidos tumorais pulverizados foram utilizados para a extração de RNA e síntese de cDNA mencionados anteriormente, assim como para a extração de proteínas.

3.9- Extração de macrófagos derivados de medula óssea

Para o processo de extração de macrófagos de medula óssea, primeiramente os animais foram eutanasiados, a região abdominal foi higienizada com álcool 70% e, com o auxílio de pinças, a pele da região da perna do animal foi removida e as patas do animal, próximo a junção bacia/fêmur foram removidas, evitando cortar ou quebrar os ossos da coxa. Os ossos foram higienizados com álcool 70% durante 1 min (antes de cortar a cabeça do osso). A cabeça do fêmur foi cortada com o auxílio de um bisturi e, com uma seringa de 5ml

ou de 10ml com uma agulha 26G encaixada na cavidade medular, removemos o conteúdo da cavidade medular. O homogenato foi dissolvido em meio de diferenciação (**Quadro 1**) e plaqueado em placas de petri que foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 3 dias de cultura, 10ml do meio de diferenciação foram adicionados as placas.

Quadro 1: Meio de diferenciação utilizado na extração de macrófagos derivados de medula óssea.

Meio de Diferenciação
60 ml de meio RPMI
20 ml de Soro fetal bovino
18 ml de meio condicionado da célula L929
1 ml de L-glutamina
1 ml de Penicilina

Após 7 dias de cultura, as células foram coletadas com o auxílio de um *cell scraper*, centrifugadas e ressuspensas em meio R10 (**Quadro 2**) e o número de células foi contato. Por fim, as células são semeadas em placas, em meio RPMI, para a realização dos ensaios.

Quadro 2: Meio R10 para cultivo de BMDM.

Meio R10
88 ml de meio RPMI
10 ml de SFB
1 ml de L-glutamina
1 ml de Penicilina

3.10 – PCR em tempo real

O cDNA resultante das células de macrófagos e dos tecidos tumorais pulverizados foram submetidos a ciclos de temperatura em uma reação de PCR em tempo real. Utilizamos *primers* de marcadores relacionados ao perfil de polarização das células tanto em M1 (*FPR2*) quanto em M2 (*EGR2* e *ARG1*), como mostra a (**Tabela 2**). Além disso, utilizamos sondas Taqman relacionadas à citocinas pró e anti-inflamatórias (**Tabela 3**) e *β-actina* e *CFA* como controle endógeno. Para as reações do sistema de detecção por *Sybergreen* utilizamos o kit PCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) e para o sistema Taqman utilizamos (Taqman Universal Master mix II, Applied Biosystem). As condições de PCR para *Sybergreen* foram: desnaturação por 2 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, e curva de melting são 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. As condições para o sistema Taqman foram: desnaturação inicial de 2 minutos a 50°C e 10 minutos a 95°C, finalmente 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1min a 60°C. Para o cálculo da expressão relativa de mRNA utilizamos os cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por LIVAK & SCHMITTGEN 2001.

Tabela 2: Lista de *primers* utilizados

<i>Primers</i>	Reverse <i>primer</i>	Foward <i>primer</i>
<i>EGR2</i>	5'-TCGGATACGGGAGATCCAGG-3'	5'-GTGGCGGGAGATGGCATGAT-3
<i>ARG1</i>	5'-CCTCGAGGAGGGGTAGAGAAA-3'	5'-GGTCTCTCACGTCATACTCTGTTT-3'
<i>FPR2</i>	5'-TCACAGACTTCATGGGGCCTT-3'	5'-CCAGTGATTCAAGCACCAGT-3'
<i>IL12B</i>	5'-TGGAGACACCAGCAAAACGA-3'	5'-GCAGCAAAGCAAGATGTGTCC-3'
<i>β-actina</i>	5'-CACAATGCCTGTGGTACG-3'	5'-TGAACCCTAAGCCAACC-3'

Tabela 3: Sondas Taqman utilizadas

Sondas Taqman	Sonda	Referência
<i>iNOS</i>	FAM	Mm00440502_m1
<i>IL-10</i>	FAM	Mm01288386_m1
<i>TNFα</i>	FAM	Mm00443258_m1
<i>CCL2</i>	FAM	Mm00441242_m1
<i>IL6</i>	FAM	Mm00446190_m1
<i>β-actina</i>	VIC	Mm02619580_g1

3.11 – Preparo das amostras para Western Blot

Células foram semeadas em placas de 6 poços na densidade de 300.000 células/poço, em meio DMEM contendo 5% de soro fetal bovino. A lise das células foi feita com tampão RIPA (NaCl 150 mM, Tris-Cl pH 7,5 20 mM, Glicerol 10%, EGTA 5 mM, EDTA 0,5 mM, Na₃VO₄ 2 mM, NaF 50 mM, triton X100 1%, SDS 0,1%, β - glicerofosfato 80 mM, NaPPi 5 mM, PMSF 1 mM) na presença de 1 μ L/mL de inibidor de proteases (P8340-Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA). Após as amostras receberem o RIPA elas foram centrifugadas a 8000g por 15min a 4°C, o sobrenadante foi coletado e realizada a dosagem pelo método de ácido bichinchoninico seguindo as especificações do fabricante (Pierce BCA Protein Assay Kit – ThermoScientific, EUA). As amostras foram diluídas em tampão TEX que contém: tris base 0,5 M, 10% de glicerol, 0,1% de dodecil sulfato de sódio SDS e azul de bromofenol 0,05%) e β -mercaptoetanol 15% a 2 μ g/ μ l, e em seguida foram desnaturadas a 100°C por 10 minutos.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 7% contendo (SDS) por cerca de 2 horas a 120v. as proteínas separadas foram transferidas para uma membrana (PVDF) ativada com metanol durante a noite a 30 v constantes. Após a transferência as membranas foram coradas com Ponceaus e lavadas com TBS- Tween (TBS-T) por 5 minutos 3 vezes, depois as membranas foram bloqueadas usando TBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado por 1 hora. Ao final deste tempo as membranas foram novamente lavadas com TBS-T por 5 minutos 3 vezes e incubadas com anticorpo primário (**Tabela 4**) diluído em TBT-T suplementado com albumina 0,5% p/v e NaN_3 0,002% e mantida sob agitação a 4°C durante a noite. No final da incubação, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas por 1 hora sob agitação lenta com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (1:10000) diluído em TBST-T contendo 5% de leite desnatado. As proteínas foram reveladas com o substrato de peroxidase quimioluminescente (GE Healthcare Bio-Sciences, Piittsburg, PA, EUA, RPN2124) e visualizadas com o auxílio do C-Digit Blot Scanner (LiCor, Lincoln, NE, EUA).

Tabela 4: Anticorpos Utilizados

Antígeno	Fabricante	Código	Diluição
pAKT (Ser473)	Cell Signaling	#9271	1:1000
pAKT (Thr308)	Cell Signaling	#9275	1:1000
AKT	Cell Signaling	#9272	1:1000
pP70S6K (Thr421/Ser424)	Cell Signaling	#9204	1:1000
pS6 (Ser235/236)	Cell Signaling	#4858	1:1000
GAPDH	Sgima Aldrich	#G9545	1:1000

pERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling	#9106	1:1000
ERK1/2	Cell Signaling	#4695	1:1000
PCNA	Cell Signaling	#2586	1:1000
VEGF	SCBT	Sc57496	1:1000
pNFkB (Ser 536)	Cell Signaling	#3036	1:1000
NFkB	Cell Signaling	#4764	1:1000
β -actina	Cell Signaling	#4967	1:1000
ARG1	SCBT	#sc166920	1:1000
iNOS	SCBT	#sc7271	1:1000

3.12- Análise estatística

Todos os gráficos e análises estatísticas foram realizados com o software Prism 8 para Mac (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, EUA). Teste t de Student, teste não paramétrico de Mann-Whitney, ANOVA de um fator seguida pelo pós-teste de Tukey e ANOVA de dois fatores seguida pelo pós-teste de Sidak foram usados conforme apropriado.

4 - Resultados

4.1 – Efeitos do CTZ na tumorigênese, produção de lactato e polarização de macrófagos em modelo animal.

Novas terapias antitumorais têm como objetivo direcionar os mecanismos que promovem a sobrevivência, recrutamento e polarização de células mielóides associadas a tumores (PATHRIA *et al.*, 2019). Uma vez que nosso grupo demonstrou que o CTZ é um agente antitumoral, conforme descrito previamente, usamos um modelo de tumor ortotópico murino com a linhagem celular de melanoma B16F10 para estudar as interações tumor-macrófago. Células B16F10 foram injetadas por via subcutânea em camundongos C57BL/6J. Posteriormente, o tratamento com CTZ foi iniciado com uma dose única diária de 200 mg/kg de CTZ por gavagem. Após 15 dias de tratamento, os tumores foram removidos e analisados (Figura 17).

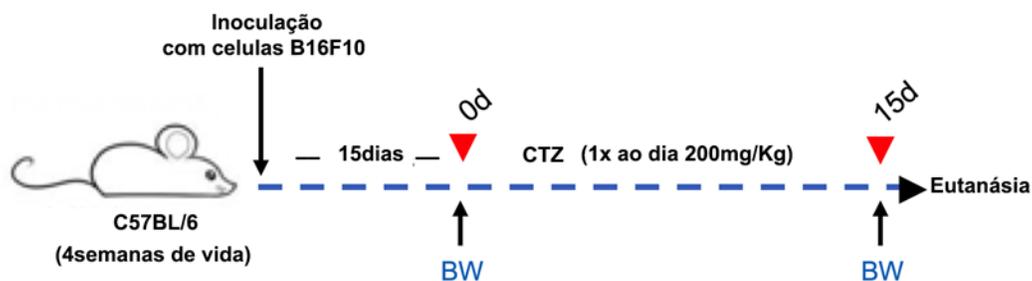


Figura 17: Modelo *in vivo*: Esquema do protocolo animal seguido no estudo.

Em nossas primeiras análises, observamos que o CTZ não interferiu no desenvolvimento dos camundongos, conforme pode ser observado pelo peso corporal dos animais (**Figura 18**) que não foi afetado pelo tratamento com o fármaco. Além disso, o CTZ também não alterou os níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (**Figura 19**), indicando que o tratamento não lesionou o fígado dos camundongos.

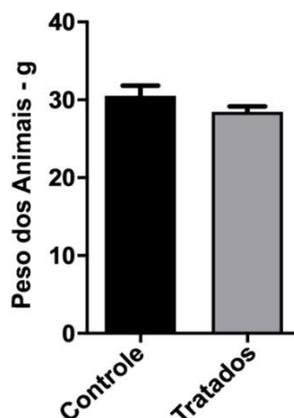


Figura 18: Efeitos do tratamento de CTZ sobre o peso corporal dos animais: Peso dos animais ao final dos 15 dias de tratamento com CTZ. Valores médios para o peso corporal dos camundongos no final do experimento (média \pm erro padrão; n = 6).

Entretanto, o tratamento com CTZ interferiu significativamente com o crescimento do tumor, com é evidente pelo volume e peso do tumor, em que os tumores dos animais tratados com CTZ têm metade do tamanho do peso dos tumores do grupo controle (**Figura 20**).

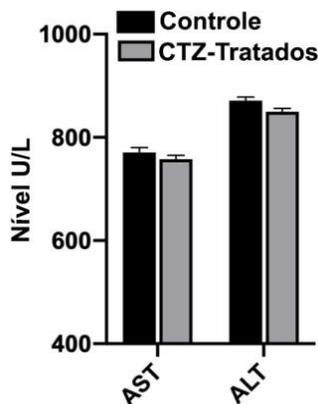


Figura 19: Efeitos do tratamento de CTZ sobre os níveis de AST e ALT: Níveis séricos de AST e ALT medidos por espectrofotometria das amostras de soro dos animais extraído ao final do tratamento. Valores médios para a atividade das enzimas hepáticas AST e ALT no soro dos animais (média \pm erro padrão; n = 6).

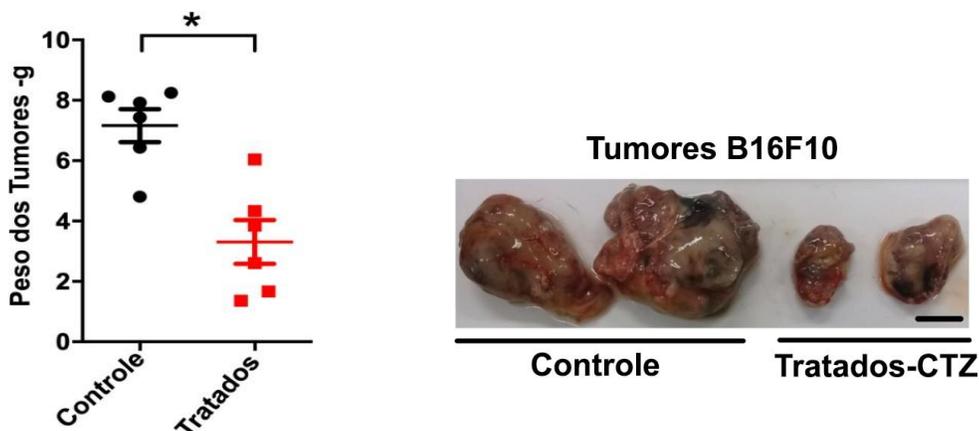


Figura 20: Efeitos do CTZ sobre o desenvolvimento de tumores de B16F10: Gráfico de dispersão do peso dos tumores, comparando o controle com o tratamento CTZ (as barras representam a média \pm erro padrão; n = 6). * indica $p < 0,05$ em comparação com o controle (teste t de Student). Imagem de tumores representativos extraídos de animais não tratados e tratados com CTZ.

Uma vez que o CTZ modula negativamente o metabolismo das células tumorais (FURTADO *et al.*, 2012; FURTADO *et al.*, 2015; MARCONDES *et al.*, 2015), avaliamos os níveis de lactato no tecido tumoral. Confirmamos que o tratamento com CTZ promoveu uma diminuição significativa no conteúdo de lactato em tumores tratados em comparação aos não tratados (**Figura 21**). No, entanto, o tratamento com CTZ não observamos uma diferença na expressão da lactato desidrogenase A (*Ldh1*) e do transportador de monocarboxilato 1 (*Mct1*) (**Figura 22**) que está implicado no desenvolvimento tumoral.

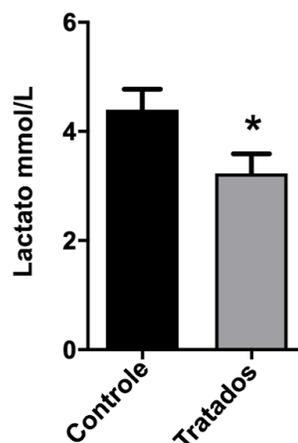


Figura 21: Efeito do CTZ no conteúdo de lactato do tecido tumoral: A partir de uma mesma quantidade de tecido tumoral pesado para ambos os grupos o lactato foi medido por espectrofotometria. Barras são médias \pm erro padrão de seis animais diferentes em cada grupo (n = 6). * indica $p < 0,05$ em comparação com o controle (teste t de Student).

Em seguida examinamos os efeitos do CTZ sobre conteúdo e polarização de macrófagos presentes no tecido tumoral. Nossos resultados mostraram uma redução robusta na expressão de *F4/80* em tumores de animais tratados com CTZ (**Figura 23**). Esse resultado indica uma redução na infiltração de TAM, uma vez que esses macrófagos são caracterizados por apresentarem alta expressão de *F4/80*. Além disso, em animais tratados com CTZ

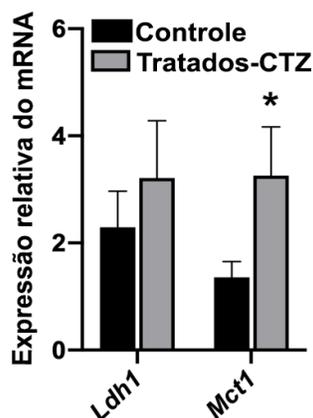


Figura 22: Efeito do CTZ na expressão de Ldh1 e Mct1 em tumores: expressão relativa de mRNA de lactato desidrogenase A (*Ldh1*) e transportador de monocarboxilato (*Mct1*) de tecidos tumorais medidos por análise de qPCR (as barras representa a média \pm erro padrão de um $n = 6$ calculados por $2^{-\Delta\Delta Ct}$; * $p < 0,05$, Teste não paramétrico de Mann-Whitney em comparação ao controle).

observamos uma regulação negativa de fatores com assinatura imunossupressora, como *Arg1*, *Mrc1* e *Egr2*, em comparação com os animais não-tratados (**Figura 23**). De acordo com esses dados, observamos que marcadores pró-inflamatórios, como por exemplo, *IL12b*, *Nos2*, *Fpr2*, *Ccl2* e *Tnfa*, foram regulados positivamente no tratamento com CTZ, sugerindo que o fármaco interfere com a repolarização dos macrófagos presentes no microambiente tumoral, possivelmente adquirindo um perfil próximo ao M1 (antitumoral) (**Figura 24**).

Consistente com a hipótese de que o CTZ está promovendo a repolarização dos TAMs, testamos se o composto promove a fosforilação do NF- κ B, o qual regula diretamente a expressão gênica de fatores pró-inflamatórios. A **Figura 25** mostra um aumento no nível de fosforilação de NF- κ B em animais tratados com CTZ. Além disso, o composto promoveu uma redução significativa na expressão de VEGF, confirmando dados obtidos em outro modelo experimental (MACHADO *et al.*, 2020).

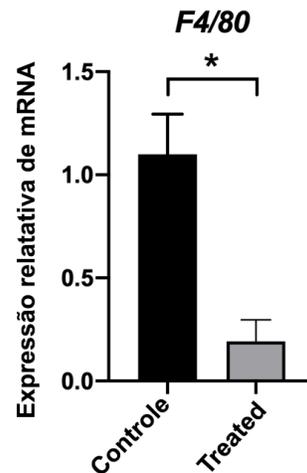


Figura 23: Infiltração de macrófagos no tecido tumoral após tratamento com CTZ: expressão relativa de mRNA do marcador de superfície de macrófago *F4/80* (*Adgre1*) de tecidos tumorais medidos por análise qPCR (as barras são a média \pm erro padrão de um $n = 6$ calculados por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ * $p < 0,05$, teste não paramétrico de Mann-Whitney em comparação ao controle).

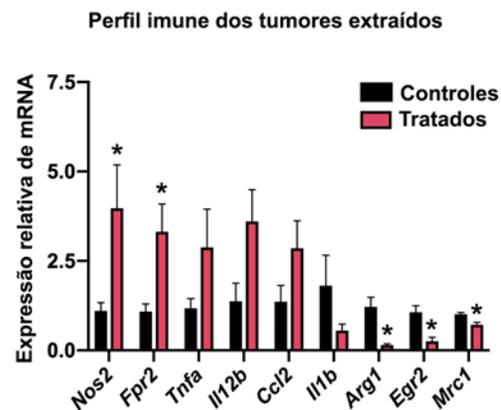


Figura 24: Polarização de macrófagos remanescentes nos tumores após tratamento com CTZ: expressão relativa de mRNA de genes de resposta imune (*Nos2*, *Fpr2*, *Tnfa*, *Il12b*, *Ccl2*, *Il1b*, *Arg1*, *Egr2* e *Mrc1*) a partir de tecidos tumorais medidos por análise de qPCR (as barras são médias \pm erro padrão $n = 6$ calculados pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$; * $p < 0,05$, teste não paramétrico de Mann-Whitney em comparação ao controle).

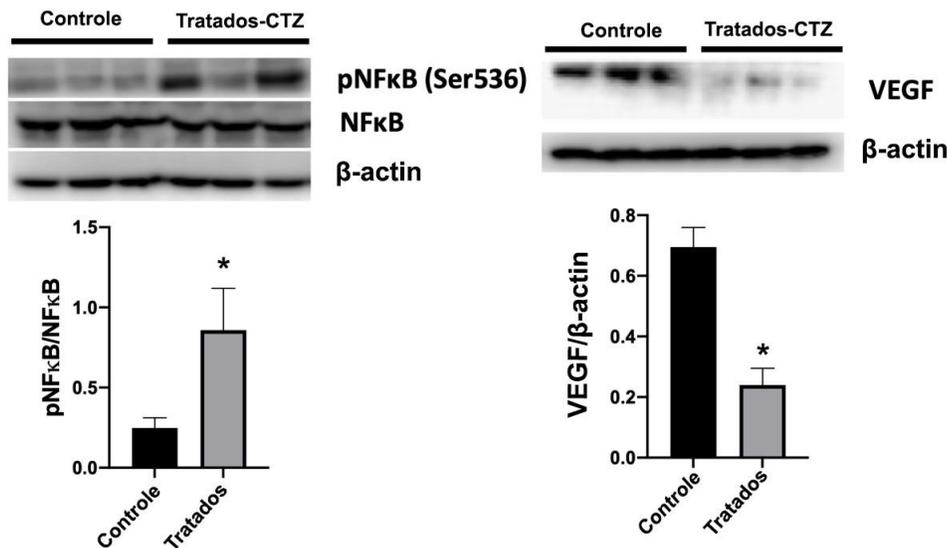


Figura 25: Efeitos do CTZ em proteínas envolvidas na inflamação e angiogênese de tumores: Análise de *Western blot* de proteínas associadas à resposta inflamatória do tumor: pNF-κB (Ser536) e NF-κB foram quantificados usando o software ImageJ e a quantificação de cada coloração é plotada nos painéis normalizados pela quantificação da coloração de proteína total (barras são média ± erro padrão, n = 3, * p < 0,05, teste t de Student). A análise de *Western blot* de VEGF foi quantificada usando o software ImageJ e a quantificação de cada coloração é plotada nos painéis normalizados pela quantificação da coloração de β-actina (as barras são a média ± erro padrão, n = 3, * p < 0,05, teste t de Student).

Estes dados, conjuntamente, sugerem que o CTZ é capaz induzir a inibição do efeito Warburg nos melanomas induzidos em camundongos. Adicionalmente, o fármaco diminuiu a infiltração de macrófagos e a polarização de TAM através da fosforilação de NF-κB e inibiu a expressão de VEGF e isso poderia estar levando a uma redução na angiogênese, com base na expressão desse marcador. Como consequência, observamos uma diminuição na proliferação de células cancerosas e, assim, um menor crescimento do tumor.

4.2 – CTZ reduz a viabilidade de células de melanoma de camundongo

Para investigar se o CTZ é capaz de modular o crescimento do tumor por meio de seus efeitos diretos sobre as células cancerosas, células de melanoma murinho B16F10 em cultura foram tratadas com concentrações crescentes do composto. Como mostra a **Figura 26**, CTZ induziu morte celular após 24h de tratamento.

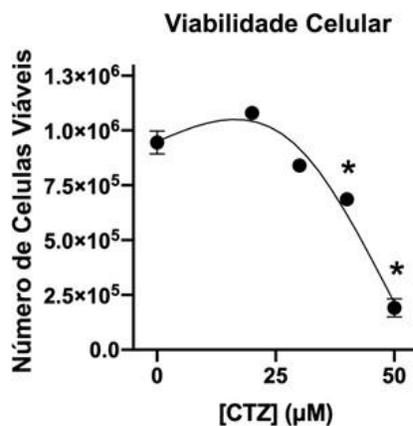


Figura 26: Ação do CTZ na viabilidade celular de B16F10: Contagem de células realizadas por azul tripan o gráfico foi plotado utilizando o número de células viáveis. As células B16F10 foram tratadas com diferentes concentrações de CTZ (0 - 50µM) por 24h. Os valores plotados são a média ± erro padrão de três experiências independentes (n = 3). Os dados foram analisados usando ANOVA de um fator, seguido pelo pós-teste de Tukey; * indica $p < 0,05$ em comparação com o controle do mesmo grupo.

4.3 – Efeito do CTZ sobre o metabolismo de glicose

Uma vez que o CTZ promoveu uma redução no conteúdo de lactato nos tumores (Figura 22), avaliamos os efeitos do fármaco sobre a captação de glicose e a produção de lactato nas células B16F10 em cultura. Observamos uma inibição de maneira dependente da concentração no ensaio de captação de glicose e em relação ao lactato produzido por estas células (**Figura 27**). Como esperado, a produção de lactato se correlacionou positivamente com a quantidade de glicose consumida pelas células B16F10. Mostrando que o tratamento com o CTZ está regulando negativamente o metabolismo da célula tumoral.

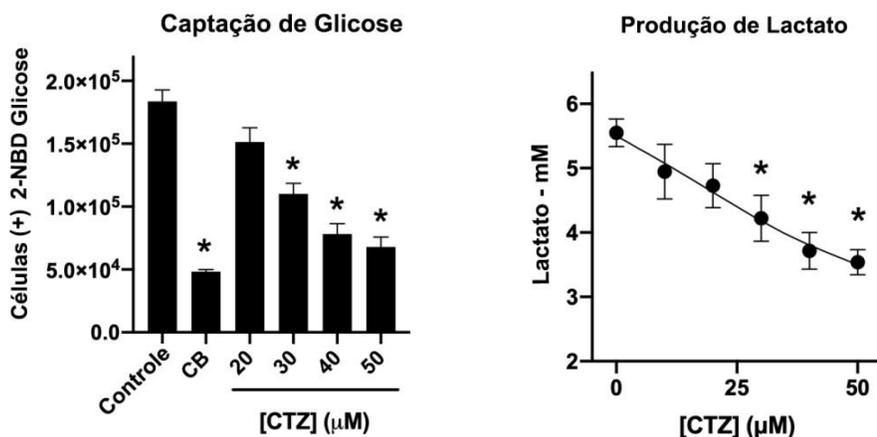


Figura 27: Efeito do CTZ sobre a captação de glicose e a produção de lactato em células B16F10: Ensaio em citometria de fluxo para captação de glicose. Dosagem de lactato feita por espectrofotometria. 20 μM de citocalasina B (CB) utilizada como controle positivo para a inibição da captação de glicose. Para ambos os ensaios foram os dados foram analisados por ANOVA de um fator, seguido do pós-teste de Tukey; * indica $p < 0,05$ em comparação com o controle do mesmo grupo.

Em seguida, procuramos avaliar os efeitos do CTZ nas enzimas limitantes da glicólise e na via das pentoses fosfato (PPP). As células foram tratadas com CTZ durante 24h, quando

foi possível observar que o CTZ promoveu uma inibição concentração-dependente da atividade das enzimas relacionadas ao metabolismo de glicose sendo a PK a enzima mais afetada (**Figura 28**). Estes resultados suportam os dados sobre a diminuição da produção e lactato e do consumo de glicose nas células B16F10 tratadas com CTZ, descritas acima.

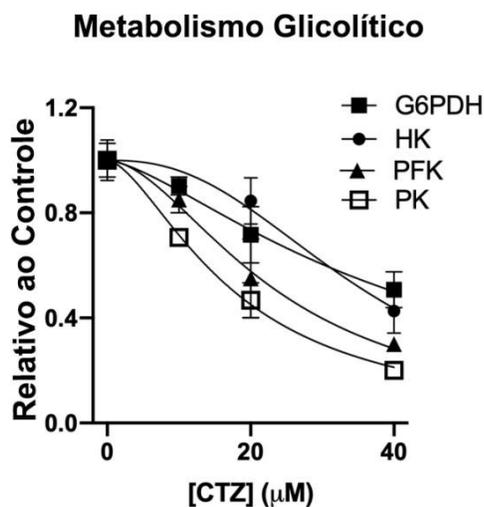


Figura 28: Efeito do CTZ sobre a Atividade Enzimática de enzimas da glicólise e PPP: Atividade enzimática de HK, PFK e PK da via glicolítica e de G6PDH da PPP foi analisada conforme descrito em Metodologia após 24h de tratamento com CTZ (0-40µM). Os valores representam média \pm erro padrão de, pelo menos, dois experimentos independentes. *indica $p \leq 0.05$ comparado ao controle.

4.4 – CTZ e atividade redutora mitocondrial

Uma vez que a glicólise é inibida pelo composto, avaliamos os efeitos do CTZ sobre a atividade redutora mitocondrial nessas células. Conforme mostrado na **Figura 29**, o CTZ diminuiu a atividade mitocondrial especialmente nas concentrações mais altas.

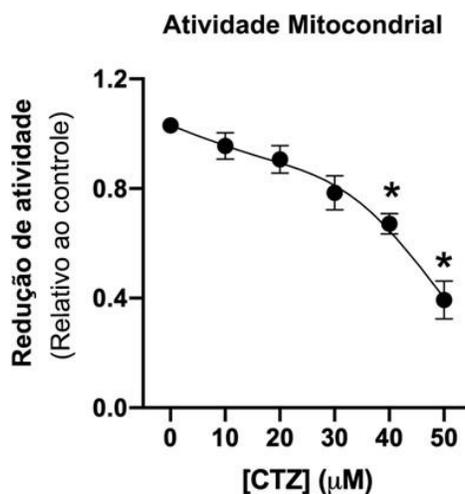


Figura 29: CTZ e atividade redutora mitocondrial: ensaio realizado por MTT, os valores plotados são a média \pm erro padrão de três experiências independentes ($n = 3$). Os dados foram analisados por ANOVA de um fator, seguida do pós-teste de Tukey e * médias $p < 0,05$ em comparação com o controle do mesmo grupo.

Neste contexto, esses achados sugerem que o CTZ modula negativamente o metabolismo das células B16F10, induzindo a morte celular.

4.5 – CTZ e o efeito sobre a fosforilação de proteínas importantes da via PI3K e MAPK

Para determinar se os efeitos do CTZ no metabolismo celular da linhagem de melanoma foram induzidos pela inibição de PI3K, como demonstrado previamente para células tumorais de mama (FURTADO *et al.*, 2015), avaliamos a via de sinalização da insulina através de ensaios de *Western blot*. Nossos resultados demonstraram que o CTZ inibiu a fosforilação de AKT em ambos os resíduos Thr308/Ser473, bem como a fosforilação de P70S6k e de S6K, além de interferir com a fosforilação ERK 1/2 nos resíduos Thr202/Tyr204 (**Figura 30 e 31**). Assim em conjunto com os outros resultados, o CTZ em células tumorais estaria reduzindo a produção de lactato devido a inibição da fosforilação de AKT.

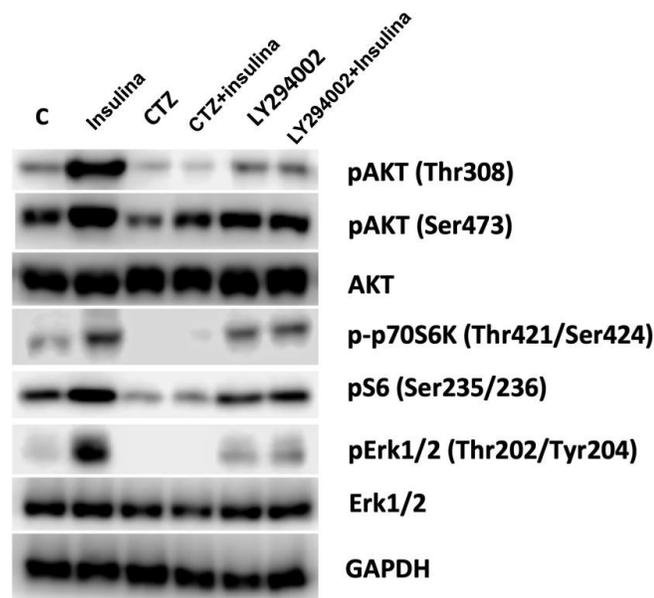


Figura 30: Efeito do CTZ na via de sinalização de PI3K e ERK 1/2: *Western blot* representativo de AKT total e fosforilada, p70S6K, S6 e ERK1/2. A sinalização da insulina foi analisado através de um lisado celular de B16F10 tratadas com 10 μ M de CTZ ou 0,5 μ M de LY294002 por 24h estimulados ou não com 100 nM de insulina por 30 min.

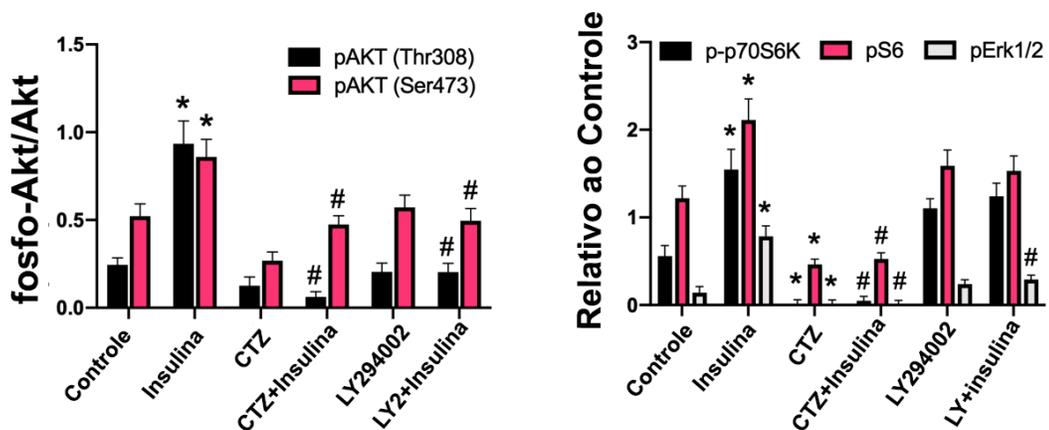


Figura 31: Quantificação dos *Western blot*: pAKT (Thr308)/AKT, pAKT (Ser473)/AKT, p-p70S6K (Thr421/Ser424)/GAPDH, pS6 (Ser235/236)/GAPDH e pERK1/2 (Thr202/Tyr204)/ERK1/2 foram quantificados usando o software ImageJ. GAPDH foi usado como controle de carregamento. Os valores são a média \pm erro padrão de três experimentos independentes (n = 3). * indica $p < 0,05$ em comparação com o controle (ANOVA de dois fatores, seguido pelo pós-teste de Tukey).

4.6 – Ação do CTZ em células B16F10 com meio condicionado de macrófagos

Nossos resultados indicaram que o CTZ diminui a produção de lactato e atividade de proteínas relacionadas à proliferação celular em células B16F10, confirmando os resultados obtidos em tumores de camundongos. Dessa forma, buscou-se avaliar se fatores secretados pelos macrófagos poderiam modular a resposta dessas células ao fármaco. Assim a linhagem celular de macrófagos Raw 264.7 foi tratada ou não com IL-4 (20ng/ml) para promover a polarização para M2 e, em seguida, as células B16F10 foram tratadas com o meio condicionado (MC) destes macrófagos por 24h. Os efeitos citotóxicos do CTZ em células B16F10 foram maiores quando as células estavam em presença do MC de macrófagos M2 (**Figura 32**) em comparação com células B16F10 tratadas com MC de macrófagos não polarizados (M0). Como esperado, o MC de Raw 264.7 induziu a proliferação de células B16F10 após apenas 24h de tratamento, um efeito que tende a ser mais pronunciado com Raw 264.7 tratada com IL-4 (**Figura 32**).

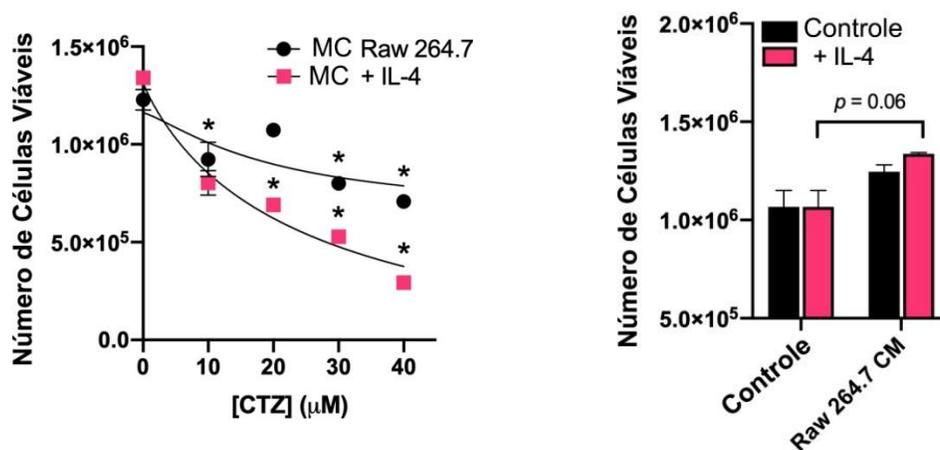


Figura 32: Efeito do CTZ em B16F10 incubada com meio condicionado de Raw 264.7: Número de células B16F10 viáveis tratadas por 24h com MC de Raw 264,7 tratadas (ou não) com 20 ng/mL de IL-4 durante 24 h. Os dados foram analisados usando ANOVA de um fator seguida pelo pós-teste de Tukey; * indica $p < 0,05$ em comparação com o controle do mesmo grupo. Proliferação de células B16F10 avaliada pelo número de células viáveis na mesma condição apresentada anteriormente (para estatísticas, foi aplicada ANOVA de dois fatores seguida pelo pós-teste de Tukey).

4.7 - Efeitos do lactato e CTZ na polarização de macrófagos

Para investigar ainda mais a relação entre células tumorais e macrófagos, macrófagos murinos J774 foram tratadas com MC de B16F10 cultivadas por 48h e 72h. Observamos que o MC de células B16F10 (72h de incubação) induziu significativamente a expressão de *Egr2*, um marcador M2 (**Figura 33**), e não alterou a expressão de *Fpr2*, um marcador M1. Analisando o conteúdo de lactato destes MCs de B16F10, observamos que existe uma correlação entre expressão de *Egr2* pelas células J774 e o conteúdo de lactato (**Figura 33**).

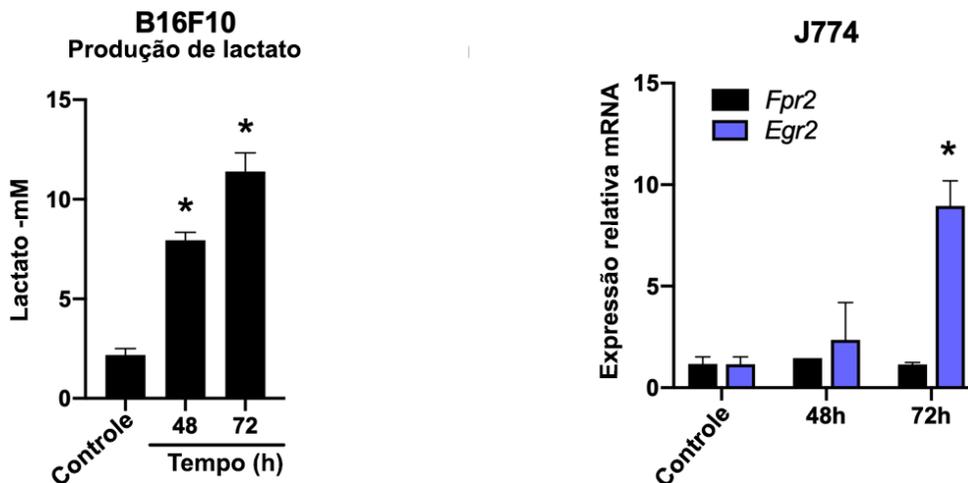


Figura 33: Efeito do meio condicionado de B16F10 em J774: Produção de lactato pelas células B16F10 após incubação por 48h e 72h. Expressão relativa de mRNA do marcador de polarização M1 (*Fpr2*) e marcador de polarização M2 (*Egr2*) avaliada por qPCR (as barras são médias \pm erro padrão calculado por $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de um $n = 3$). As células J774 foram incubadas com MC de B16F10. Controle representa meio sem células. *indica $p < 0,05$ em comparação com o controle (teste de Mann-Whitney).

Para confirmar que o lactato induz a expressão de marcadores do tipo TAM, ou seja M2, analisamos a expressão de mRNA de marcadores de ativação de macrófagos em células Raw 264.7 e J774, além de BMDM, estimulados com IL-4, LPS+IFN γ e lactato. Nossos resultados mostraram que 30mM de lactato aumentou a expressão de *Egr2* e *Arg1* em macrófagos murinos após 24h de tratamento (**Figura 34**). Além disso, genes relacionados aos TAMs são superexpressos quando BMDMs foram tratados com 30mM de lactato ou 10ng/ml de IL-4 durante 24h (**Figura 34**). Mostrando que o lactato pode levar a polarização dos macrófagos para um perfil semelhante ao M2 encontrado no microambiente tumoral.

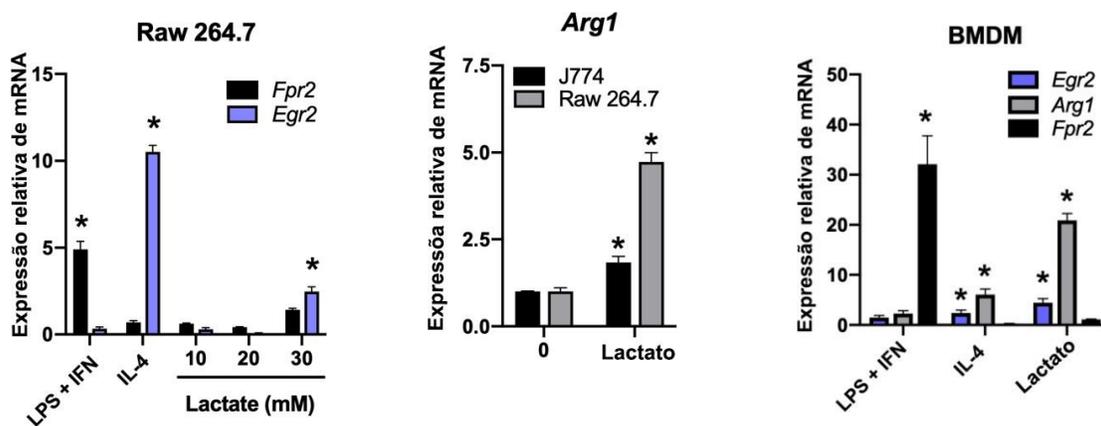


Figura 34: Efeito do lactato na polarização de macrófagos: Expressão relativa de mRNA de *Fpr2* e *Egr2* em células Raw 264.7 tratadas com 100 ng/mL LPS + 20 ng/mL IFN γ , 20 ng/mL IL-4 ou 10-30 mM de lactato de sódio por 24h avaliado por qPCR (n = 3). Expressão relativa de *Arg1* em células J774 e Raw 264.7 tratadas ou não com lactato de sódio 30 mM avaliado por qPCR (n = 3). Expressão relativa de *Fpr2*, *Egr2* e *Arg1* em BMDM tratados com 100 ng/mL LPS + 20 ng/mL IFN γ , 10 ng/mL IL-4 ou 30 mM de lactato de sódio por 24h avaliado por qPCR (n = 3). Para todos os qPCR as barras são médias \pm erro padrão calculados por $2^{-\Delta\Delta Ct}$. * indica p < 0,05 em comparação com o controle (teste de Mann-Whitney).

Em seguida, investigamos se o lactato poderia modular o processo de polarização de macrófagos J774 induzida pelos promotores clássicos M1 e M2, LPS+IFN γ e IL-4 respectivamente. Conforme mostrado na **Figura 35** o lactato reverteu a superexpressão de *Fpr2* induzida por LPS+IFN γ . Por outro lado, 30 mM de lactato aumentou a expressão de *Egr2* na mesma proporção do que foi observado com o tratamento com 20 ng/ml de IL-4 após 48 h de tratamento. Além disso, o tratamento sequencial com ambos os indutores M2 potencializou a expressão de *Egr2* mais do que na estimulação única com IL-4 ou lactato.

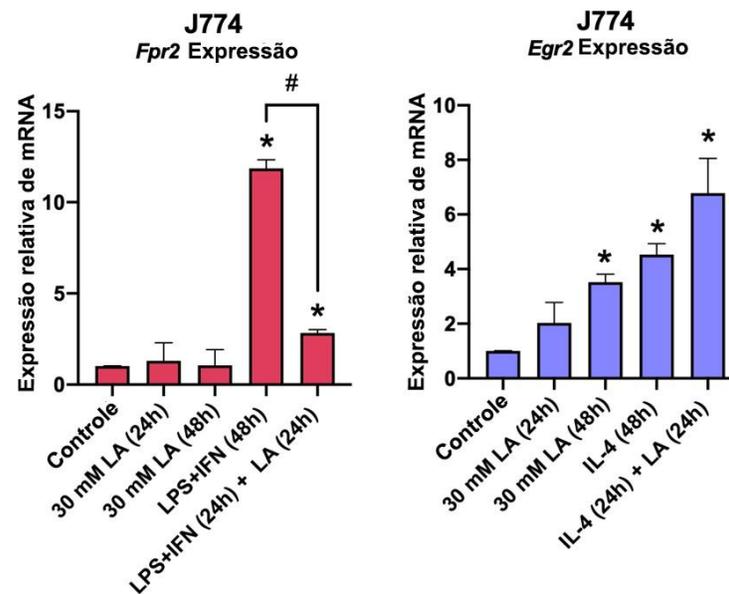


Figura 35: Repolarização de J774: Expressão relativa de mRNA de *Fpr2* ou *Egr2* em J774 tratada conforme descrito na sessão de Materiais e Métodos e avaliada por qPCR (as barras são médias \pm erro padrão calculado por $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de um n= 3). * indica p <0,05 em comparação com o controle (teste de Mann-Whitney).

Sabendo-se que o CTZ reduz a viabilidade de células tumorais, avaliamos os efeitos deste composto sobre a viabilidade dos macrófagos murinos em cultura. CTZ promoveu diminuição concentração-dependente na viabilidade de ambas as células (**Figura 36**), atingindo uma redução de 45% na viabilidade celular na concentração de 40 μ M de CTZ. Porém, o resultado mais interessante e que gostaríamos de destacar foi que o composto é mais citotóxico para macrófagos polarizados para M2 quando comparamos os efeitos do mesmo sobre os macrófagos do tipo M1 (**Figura 36**). Estes dados sugerem que o CTZ reduziu a tumorigênese no modelo animal através dos seus efeitos citotóxicos não somente sobre as células tumorais,mas também sobre os TAM.

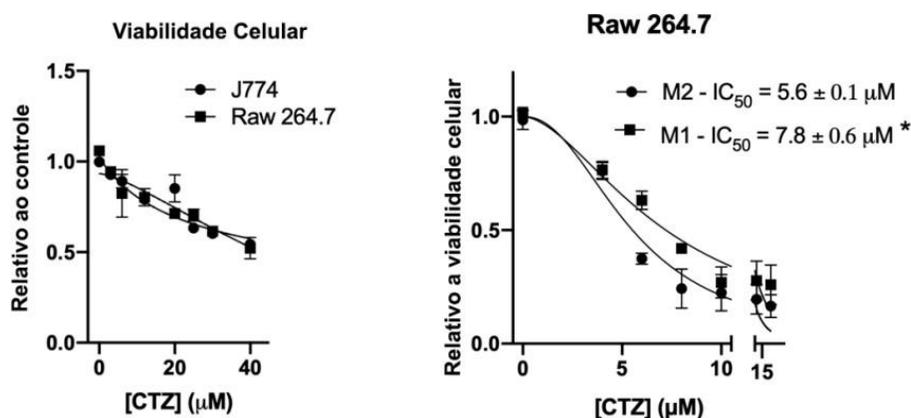


Figura 36: Viabilidade celular de macrófagos tratados com CTZ: Viabilidade celular J774 e Raw 264,7 avaliada por MTT após tratamento com CTZ por 24h (n = 3). A direita: Viabilidade de Raw264.7 polarizada para M1 ou M2 após o tratamento com CTZ, conforme descrito na sessão de Materiais e Métodos (n = 3). Os dados foram analisados por ANOVA de um fator, seguida do pós-teste de Tukey. * indica $p < 0,05$ em comparação com o controle do mesmo grupo.

Para determinar se CTZ regula diretamente a polarização de macrófagos, analisamos as expressões de mRNA e de proteínas em células Raw 264.7 e BMDM estimulados com IL-4 ou lactato e tratadas com 10 μ M de CTZ durante 24h. Encontramos resultados semelhantes em ambas às células, onde o lactato induziu a expressão de *Egr2* e *Arg1*, enquanto CTZ promoveu a expressão de *Fpr2* (**Figura 37**). Além disso, CTZ reverteu a expressão de marcadores M2 induzida por lactato em BMDM e, adicionalmente, em Raw264.7 vimos um aumento na expressão de *Fpr2*. Confirmamos este último resultado analisando a expressão de iNOS, um importante marcador pró-inflamatório, onde sua expressão foi maior em células BMDM co-tratadas com lactato e CTZ (**Figura 38**). Além disso, a análise mostrou que 30 mM de lactato promoveu um aumento na expressão de *Arg1*, a qual foi revertida por 10 μ M de CTZ. Finalmente, BMDM tratados com IL-4 e CTZ mostraram que o composto não reverteu a expressão de *Arg1* induzida por 10ng/ml de IL-4, mas aumentou significativamente a expressão de iNOS nesta condição.

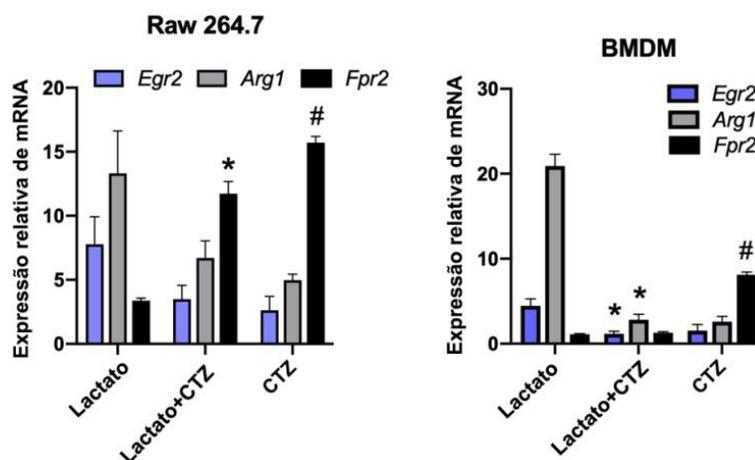


Figura 37: Ação do CTZ na repolarização de macrófagos: Ensaio de qPCR da linhagem Raw 264.7 e de BMDM após tratamento com 30 mM de lactato de sódio e/ou 10 μ M de CTZ. As barras são médias \pm erro padrão de um n=3 calculados por $2^{-\Delta\Delta C_t}$. * indica $p < 0,05$ em comparação com o controle (teste de Mann-Whitney).

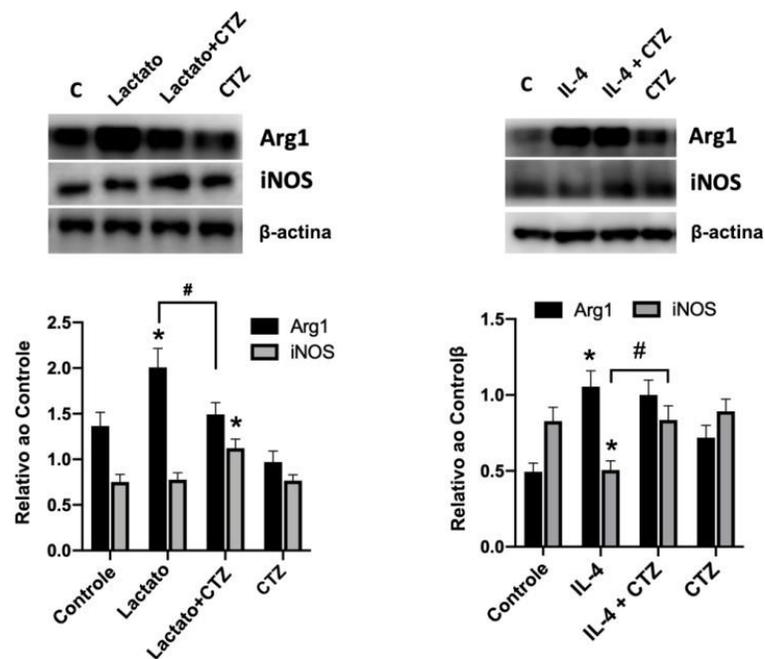


Figura 38: Expressão de iNOS e Arg1 em BMDM tratados com CTZ, lactato e IL-4: A expressão de iNOS e Arg1 foram avaliadas por *Western blot*. Os gráficos de barras representam quantificações médias de imunoblots de pelo menos três experimentos independentes. * indica $p < 0,05$ em comparação com o controle para a mesma proteína e # indica $p < 0,05$ entre as condições marcadas (teste t de Student).

5- Discussão

A relação entre o câncer o sistema imune do organismo vem ganhando grande destaque atualmente. Esses dois componentes podem auxiliar no desenvolvimento de diversas novas abordagens terapêuticas, como também auxiliar no entendimento do desenvolvimento da célula tumoral. Dessa forma, um estudo detalhado de como os diversos fatores produzidos pela célula tumoral afetam células como macrófagos podem nos auxiliar no melhor entendimento da relação célula tumoral-sistema imune.

No presente trabalho, avaliamos os *crossstalk* entre células tumorais e TAMs avaliando a resposta individual dessas células ao tratamento com CTZ ou em um modelo de melanoma murino. Nós observamos o efeito antitumoral do CTZ, que já foi demonstrado para modelos de tumor de mama, acrescentando que o composto também interfere com a biologia e função do microambiente tumoral. De fato, o composto desencadeou uma inibição da tumorigênese no modelo de melanoma por meio da supressão do metabolismo glicolítico e, conseqüentemente, do conteúdo de lactato no microambiente tumoral. Nosso estudo está em acordo com diversas abordagens terapêuticas que têm sido utilizadas para diminuir a produção de lactato pela célula tumoral, seja inibindo translocadores de lactato da célula ou interferindo com componentes de vias metabólicas importantes, afetando a produção de lactato (XIE *et. al.*, 2020). Neste contexto, utilizamos em nosso estudo o CTZ, pois diversos estudos mostraram um potencial antitumoral desse composto, além disso, este pode interferir com parâmetros metabólicos da célula tumoral (YARDIMICI, 2020; ZANCAN *et al.*, 2007; MARCONDES *et al.*, 2010; FURTADO *et al.*, 2012; FURTADO *et al.*, 2015).

Nas análises do tecido tumoral do nosso modelo *in vivo*, foi visto que no grupo de animais que recebeu o tratamento com CTZ houve uma redução na concentração de lactato no tecido tumoral. Este grupo também apresentou uma menor massa tumoral. Dessa forma observamos que o tratamento com CTZ afetou o metabolismo do tumor e reduziu a sua produção de lactato. Em seguida, quando analisamos o conteúdo de macrófagos presentes nessa massa tumoral, através da expressão de *F4/80*, vimos uma diminuição dos macrófagos infiltrados nos tumores dos animais tratados com CTZ. Uma vez que o número de TAM em tumores está correlacionado com a menor sobrevida pra diferentes tipos de câncer, nossos dados apontam para uma importância terapêutica do efeito do CTZ reduzindo a infiltração de macrófagos.

Posteriormente, avaliamos os principais marcadores relacionados ao processo de polarização de macrófagos. Observamos que os marcadores relacionados ao fenótipo M1 estão com uma maior expressão nos animais que receberam CTZ, enquanto que marcadores relacionados ao fenótipo M2 apresentaram uma menor expressão. Estes resultados sugerem duas hipóteses: a primeira é que, devido à diminuição da produção de lactato pelo tratamento com CTZ, isto estaria afetando a polarização desses macrófagos e, conseqüentemente, menos macrófagos estariam sendo polarizados para o perfil semelhante ao M2. A segunda hipótese seria a de que o próprio CTZ estaria afetando a polarização dos macrófagos presentes no microambiente tumoral e estes teriam um perfil antitumoral o que, conseqüentemente, afetaria o crescimento tumoral. Além disso, analisando a fosforilação de NF- κ B em tumores tratados com CTZ, vimos um aumento na fosforilação desse fator de transcrição ligado ao fenótipo M1. Assim, esses resultados indicam que o CTZ diminuiu o efeito *Warburg* em tumores tratados, afetando a infiltração e polarização de TAM através da fosforilação de NF-

kB e poderia estar afetando a angiogênese com base no resultado de VEGF. Como consequência observamos uma menor diminuição na proliferação de células cancerosas.

Avaliamos os efeitos diretos do CTZ sobre as células de melanoma agressivo B16F10, observamos um efeito citotóxico do composto sobre estas células. O CTZ, como em outros modelos de câncer (FURTADO *et al.*, 2012; FURTADO *et al.*, 2015; MARCONDES *et al.*, 2015), modula negativamente o metabolismo energético das células B16F10 induzindo a morte celular das mesmas. De forma semelhante, em um trabalho realizado por ADINOLFI *et al.*, 2015 num modelo de melanoma humano, foi observado que o CTZ interfere tanto na viabilidade celular quanto na expressão e atividade da enzima HK após 48h de tratamento com 20 μ M do composto. Esses dados corroboram nossos resultados e demonstram que o CTZ pode interferir diretamente com atividade das enzimas glicolíticas e, com isso, levar a uma menor produção de lactato pela célula tumoral. Entretanto, grande parte do metabolismo tumoral é regulado pela via PI3K. Portanto, uma análise mais específica sobre os efeitos do CTZ em componentes dessa via seria importante para determinar o real efeito do fármaco na diminuição dos níveis de lactato intratumorais observada aqui.

A via PI3K/AKT está relacionada com diversos eventos celulares dentre eles a regulação do metabolismo celular (JIANG *et.al*, 2020). Além disso, diversas alterações em proteínas da via PI3K/AKT/mTOR foram vistas como fatores de risco para o desenvolvimento de diversos tipos de câncer (JIANG *et.al*, 2020). A ativação de PI3K/AKT promove o aumento do metabolismo glicolítico, seja por meio da translocação para a membrana de transportadores de glicose mediada por AKT ou pela ativação de HK e PFK dependente desta quinase (KANEDA *et al.*, 2016). Em melanomas foi observado que a

tumorigênese foi acompanhada de alterações genéticas em componentes da via PI3K bem como de seu inibidor, a proteína PTEN; assim, diversas proteínas dessa via têm sido estudadas como possíveis alvos terapêuticos para o tratamento de câncer do tipo melanoma (DURBAN *et.al*, 2013). Em nosso estudo avaliamos os efeitos do CTZ em proteínas da via PI3K em células B16F10, uma vez que este composto é um inibidor de PI3K, como observado em um modelo de células de tumor de mama MCF-7 por FURTADO *et. al*, 2015. Aqui, confirmamos que o CTZ age como um inibidor de P3IK em B16F10, uma vez que o fármaco inibiu a fosforilação de AKT nos resíduos de Thr308 e Ser473, além de promover a inibição da fosforilação de proteínas *downstream* a AKT, como p70S6K e S6K.

Também avaliamos os efeitos do CTZ na fosforilação de ERK 1/2, pois a ativação desta via está relacionada com a coordenação de eventos celulares relacionados como diferenciação e proliferação em melanócitos (WELLBROCK & AROZARENA, 2016). Vimos que o CTZ pode interferir com a fosforilação de ERK1/2 em resíduos responsáveis por sua ativação. Este dado é interessante uma vez que aponta que o CTZ interfere com as principais vias de sinalização presentes na célula tumoral, comprometendo seu metabolismo e sua proliferação, diminuindo assim seu perfil invasivo.

Avaliamos a resposta de B16F10 ao tratamento com CTZ quando essas células foram expostas ao MC de macrófagos Raw 264.7 tratados ou não com IL-4 (JHA *et al.* 2015; NOY & POLLARD, 2014). Nossos resultados mostraram que, além de favorecer o crescimento celular após somente 24h, a exposição das células tumorais ao MC dos macrófagos polarizados para M2 sensibiliza as mesmas ao CTZ. Conseqüentemente, observamos um efeito citotóxico mais pronunciado do composto nesta condição. Estes dados sugerem que o

CTZ pode apresentar efeitos mais citotóxicos sobre células tumorais num microambiente tumoral complexo, onde os TAM participam da sinalização pró-tumoral.

De fato, os macrófagos são uma peça-chave no desenvolvimento da célula tumoral, pois estes exercem funções como remodelagem de crescimento de tecido, regulação da inflamação e possuem a capacidade de afetar o crescimento tumoral através da liberação de fatores de crescimento (TARIQ *et.al*, 2017). Investigamos aqui, os efeitos do principal produto do metabolismo tumoral sobre a ativação de macrófagos. Os efeitos do lactato na polarização de macrófagos foram avaliados utilizando tipos diferentes de células em cultura (linhagens celulares e primárias) para mimetizar o que poderia estar ocorrendo no microambiente tumoral. Nossos resultados confirmaram os dados de COLEGIO *et al.*, 2014, mostrando que o MC das células tumorais induz a polarização de macrófagos para o perfil TAM. Além disso, em nossas análises, observamos que o lactato reverte a expressão *Fpr2*, induzida por LPS+IFN γ , e potencializa a expressão de *Egr2*, estimulada por IL-4. Esses dados corroboram com o fato de que o lactato é uma importante molécula sinalizadora que contribui para a polarização de macrófagos e para crescimento e a manutenção da célula tumoral (YU *et al.*, 2007).

Os resultados apresentados aqui sugerem que o CTZ induz a ativação de macrófagos para M1 em ambas as células Raw 264.7 e BMDM. Além disso, o CTZ reverteu a polarização M2 induzida por lactato e induziu a expressão de *Fpr2* apresentando efeitos particulares em cada célula, mas que globalmente indicam que esses macrófagos adquiram um perfil antitumoral. Talvez o mais importante a ser pontuado aqui seja que a repolarização dos TAMs para um fenótipo semelhante a M1 gera respostas antitumorais expressivas em modelos murinos corroborando dados obtidos por outros autores (BROMBERG *et.al* 1999). Estes

resultados foram confirmados por *Western blot*, onde o CTZ induziu a expressão de iNOS em BMDMs co-tratados com lactato, IL-4 e CTZ. Reforçamos que o lactato, assim como IL-4, induz a expressão de proteína *Arg1* em macrófagos que é parcialmente prevenida pelo CTZ quando induzida pelo lactato, mas não inibida pelo tratamento com CTZ em células estimuladas por IL-4.

Neste contexto existem diversas moléculas sinalizadoras que poderiam estar atuando no processo de polarização desses macrófagos para o perfil TAM, algumas delas, como a PI3K γ , AKT-ERK e STAT3 são relacionadas à polarização para o perfil M2 (SICA & MONTOVANI, 2016). Como os TAM exibem um perfil muito semelhante ao M2 estas moléculas poderiam estar sendo expressas nestes macrófagos por ação do lactato tumoral (MU *et.al*, 2018). Cabe destacar, que um estudo realizado por JOSHI *et.al*, 2014 mostrou que, em camundongos com a deleção para a PI3K γ em macrófagos, apresentaram um menor crescimento tumoral e uma menor liberação de fatores angiogênicos por parte dos macrófagos presentes no microambiente tumoral. Em nosso trabalho infelizmente não somos capazes de analisar os efeitos do CTZ na via PI3K em macrófagos, possivelmente devido a especificidade dos anticorpos usados e as diferenças em alguns resíduos de fosforilação ou isoformas de proteínas nesta via de sinalização encontrada em macrófagos. Na verdade, PI3K γ , a isoforma de PI3K predominante em células mielóides, é ativada por quimioatraentes, sendo abundantemente expressa em células mielóides, mas não em células cancerosas (SUN *et.al* 2017) e promove o tráfego de células mielóides durante a inflamação no câncer (KANEDA *et al.*2017). Sua inibição não afeta diretamente o crescimento ou a sobrevivência das células tumorais, que não expressão essa quinase (EVANS *et al.*, 2016). No entanto, PI3K γ está associado a resposta anti-inflamatória mediada por macrófagos. De

fato, embora a inibição de PI3K γ não altere o acúmulo de TAM em tumores, ela promove a expressão de citocinas pró-inflamatórias e inibe a expressão de fatores supressores do sistema imunológico em tumores e TAM, indicando que esta quinase é capaz de regular se TAM terá atividade imunossupressora ou estimulante (KANEDA *et al.*, 2016). A avaliação desta via de sinalização em macrófagos é alvo de estudos em outro projeto em curso no Laboratório.

Novas abordagens terapêuticas, direcionadas aos macrófagos presentes no microambiente tumoral estão sendo investigadas (NAJAFI *et al.*, 2018). Muitas dessas terapias estão voltadas para a repolarização ou reprogramação desses macrófagos, utilizando composto que interferem com vias importantes para o processo de polarização (PATHRIA *et al.*, 2019). Uma das abordagens que vem sendo estudadas é a repolarização de TAMs através da inibição da via PI3K (PATHRIA *et al.*, 2019). Estudos que utilizaram a inibição farmacológica ou genética de PI3K resultaram na ativação de células T e supressão do crescimento tumoral (PATHRIA *et al.*, 2019).

Uma compreensão mais ampla do espectro de polarização de macrófagos poderia auxiliar diversas novas abordagens terapêutica que poderiam estar atuando em subgrupos de macrófagos polarizados presentes no microambiente tumoral, o que também auxiliaria na maior compreensão entre a interação sistema imune e tumor (XUE *et.al*, 2014). Assim, um estudo mais detalhado sobre as vias de sinalização e fatores de transcrição envolvidas na polarização de macrófagos do microambiente tumoral ganha destaque atualmente, pois estes macrófagos apresentam algumas diferenças da polarização clássica observada na imunologia. Portanto, análises mais detalhadas sobre o papel de cada via podem identificar novas abordagens de estudo e ampliar nosso conhecimento a respeito do desenvolvimento tumoral e o papel dos macrófagos nesse processo.

Em conclusão, confirmamos que o lactato derivado de tumor modula a polarização de macrófagos induzindo características semelhantes a M2, expressão de *Arg1* e outros genes associados aos TAMs. No entanto, a depleção ou repolarização de TAMs em tumores é uma estratégia terapêutica promissora (KANEDA *et al.*, 2016). Na verdade, nossos dados mostraram que a diminuição da infiltração de TAM e a promoção da polarização do tipo M1 foram associadas à redução da massa tumoral em camundongos tratados com CTZ. Além disso, esses efeitos de CTZ em macrófagos podem potencialmente aumentar as respostas antitumorais mediadas por células T e melhorar a eficácia da imunoterapia (SUN *et al.*, 2017). Os mecanismos envolvidos na polarização M2 induzida pelo lactato ainda precisam ser elucidados. No entanto, nossos resultados indicam claramente que o CTZ pode apresentar efeitos anticâncer promissores em células de melanoma, interferindo simultaneamente na polarização de TAMs e na biologia das células cancerosas.

6-Conclusões

Como conclusões gerais desta Tese podemos dizer que:

- 1) em células tumorais o CTZ inibe a via da PI3K promovendo a inibição do metabolismo glicolítico tumoral com conseqüente redução da produção de lactato por estas células;
- 2) o lactato secretado pelas células tumorais induz a polarização de macrófagos para um perfil M2, ou seja, pró-tumoral;
- 3) o CTZ induz a repolarização dos macrófagos para um perfil M1 (pró-inflamatório) contribuindo para sua ação anticâncer.
- 4) Nossos resultados demonstram que este fármaco apresenta efeitos promissores agindo sobre ambos os tipos celulares atuando, especialmente, no *crosstalk* entre células tumorais-macrófagos (**Figura 39**).

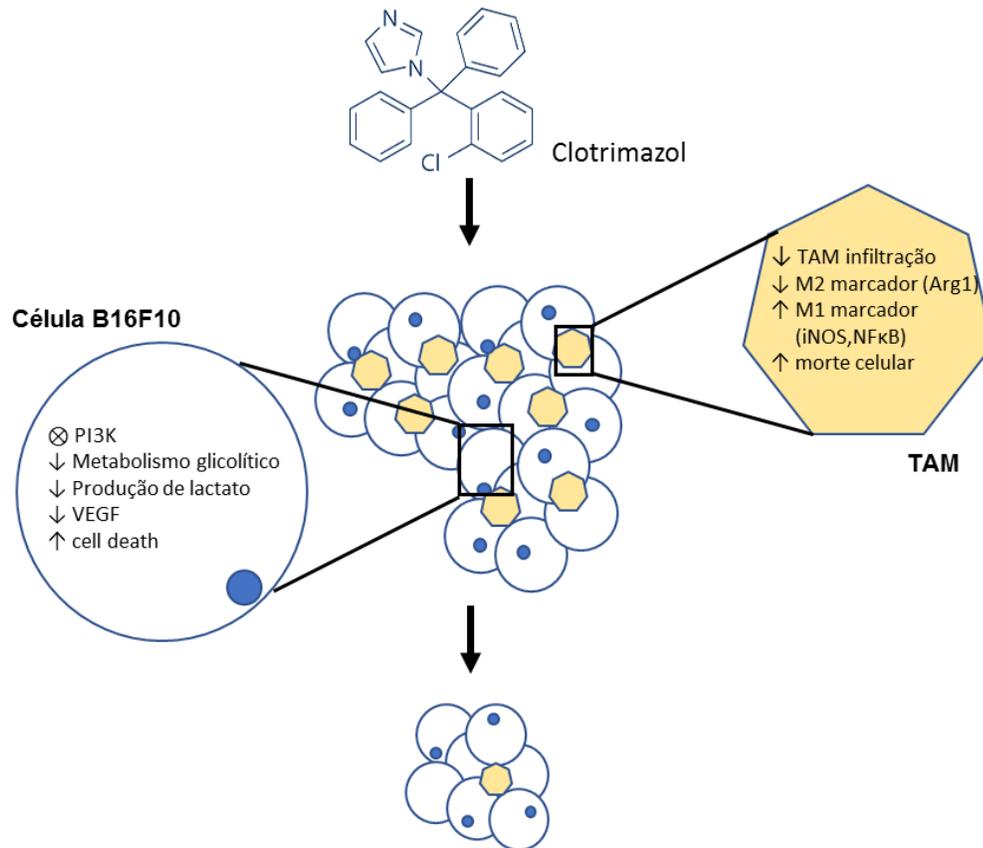


Figura 39: Ação do CTZ em células tumorais e macrófagos presentes no microambiente tumoral: CTZ interfere com o metabolismo celular tumoral, inibindo a sinalização de PI3K na célula, e atua diminuindo a infiltração e afetando a polarização de macrófagos presentes no microambiente.

7-Referências

ACCARDI G., SHIVAPPA N., DiMASO M., HÉRBERT J.R., FRATINO L., MONTELLA M., VECCHIA C.L., CARUSO C., DIEGO S., LIBRA M., POLESEL J. Dietary inflamTAMory index and câncer risk in the elderly: A pooled-anlysis of Italian case-control studies. **Nutrition**. v63. p.205-210.2019.

ADINOLFI B., CARPI S., ROMANINI A., POZZO E., CASTAGNA M., COSTA B., MARITINI C., OLESON S-P., SCHMITT N., BRESCHI M C., NEIRI P., FAOGLI S., Analysis of the Antitumor Activity of Clotrimazole on A375 Human Melanoma Cells. **Anticancer Research**. v.35 p. 3781-3786. 2015.

AGGARWAL B.B. Signalling pathway of the TNF superfamily: A Double-Edged sword. **Nature Reviews Immunology**. v3. P.745-756. 2003.

ANDANY M.A., OJÉN M.L., CALDERÓN R.F., RODRIGUEZ E.A., GARCIA C.D., ALTESOR M.V., SEIJAS J.R. Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion*. v17. p.76-100. 2014.

ANCEY P.B., CONTAT C., MEYLAN E. Glucose transporters in cancer – from tumor cells to the tumor microenvironment. **The Febs Journal**. p.2926-2943. 2018.

AMIT I., WINTER D.R., JUNG S. The role of the local environment and epigenetics in shaping macrophage identity and their effect on tissue homeostasis. **Nature Immunology**. v17.p.18-25.2015.

ARRAGOIZ R., DORANTES J., CORDERA F., JUAREZ M.M., PAQUENTIN E.M., LÉON L. Melanoma Review: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis and Staging. **Science PG**. v4. p.1-15. 2016.

BENZAQUEN L.R., BRUGNARA C., BYRES H.R., CELLI S.G., HALPERIN J.A. CTZe inhibits cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. **Nature Medicine**. v1. 534-540. 1995.

BONNET G.A., MUKHERJEE R. Cytokine-mediated communication: a quantitative appraisal of immune complexity. **Nature Reviews Immunology**. v.19. p.205-217. 2019.

BOROUGHES L.K., DeBERARDINIS R.J. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. **Nature cell Biology**. v.4.p.351-359. 2015.

- BOWMAN R.L., KLEMM F., AKKARI L., PYONTECK S.M., SEVENICH L., QUALI D.F., DHARAS S., SIMPSON K., GARDNER E.E., DONAHUES C.A. L., BRENNAN C.W., TABAR V., GUTIN P.H., JOYCE J.A. Macrophage ontogeny underlies differences in tumor-specific education in brain malignancies. **Cell Rep.** v.17. p. 2445–2459. 2016.
- BROMBERG, J. F., WRZESZCZYNSKA, M. H., DEVGAN, G., ZHAO, Y., PESTELL, R. G., ALBANESE, C., & DARNELL, J. E. Stat3 as an oncogene. **Cell**, 98(3), 295–303. 1999.
- CAI B., CAI J., LUO Y., CHEN C., ZHANG S. The Specific Roles of JAK/STAT Signaling Pathway in Sepsis. v.38. p.1599–1608. 2015.
- CAÑAVERAS J.C., CHEN L., RABINOWITZ J. The Tumor Metabolic Microenvironment: Lessons from Lactate. **Cancer Research.** v.79. p.3155–3162.2019.
- CASTELLI M.V., BUTASSI E., MONTEIRO M.C., SVETAZ L., VICENTE F., ZACCHINO S. Novel antifungal agents: a patent review (2011 -- present). **Informa Healthcare.** v.4.p.323-338. 2014.
- CHANG C.H., QIU J., SULLIVAN D., BUCK M.D., TAKURO N., CURTIS J.D., CHEN Q., GINDIN M., GUBIN M.M., WINDT G.J.W., TONC E., SCHREIBER R.D., PEARCE E.J., PEARCE E. Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression. **Cell Press.** v.6. p.1229-1241. 2015.
- CLARK W.H., ELDER D.E., GUERRY D., EPSTEIN M.N., GREENE M.K., HORN M.V. A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Human Pathology.** v.15. p.1147-1165. 1984.
- COLEGIO O R., CHU N Q., SZABO A.L.,CHU T., RHEBERGEN A M., JAIRAM V., CYRUS N., BROKOWSKI C E., EISENBARTH S C., PHILLIPS G M., CLINE G., PHILLIPS A J., MEDZHITO R., Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. **Nature.** v,513. p. 559-576. 2014.
- COLEGIO O.R. Lactic acid polarizes macrophages to a tumor-promoting state. **Onco Immunology** v.5. p. e1014774-1-e1014774-3. 2016.
- CORICOVAC D., DEHELEAN C., MOACA E.A., PINZARU I., BRATU T., NAVOLAN D., BORUGA O. Cutaneous Melanoma—A Long Road from Experimental Models to Clinical Outcome: A Review. **International Journal of Molecular Sciences.** v.19. p.1-18. 2018.

COUPER K.N., BLOUNT D.G., RILEY E.M. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. **The journal of immunology**. v.180. p.5771-5777. 2008.

DOMINGUES B., LOPES J.M., SOARES P., PÓPULO H. Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and Therapy**. v.7. p.35-49. 2018.

DURBAN V M., DEUKER M M., BOSENBERG M W., PHILLIPS W., McMAHON M., Differential AKT dependency displayed by mouse models of BRAFV600E-initiated melanoma. **The Journal of Clinical Investigation**. v.123 p.5104-5118. 2013.

EVANS C A., LIU T., LESCARBEAU A., NAIR S J., GRENIER L., PRADEILLES J A., GLENADEL Q., TIBBITTS T., ROWLEY A M., DiNITTO J P., BROPHY E E., HEARN E L O., ALI J A., WINKLER D G., GOLDSTEIN S I., O'HEARN P., MARTIN C M., HOY J G., SOGLIA J R., CHEUNG C., PINK M M., PROCTOR J L., PALOMBELLA V J., TREMBLAY M R., CASTRO A C. Discovery of a Selective Phosphoinositide-3-Kinase (PI3K)- γ Inhibitor (IPI-549) as an Immuno-Oncology Clinical Candidate. **ACS medicinal chemistry letters**. v7. 862–867. 2016.

EPELMAN S., LAVINE K.J., RANDOLPH G.J., Origin and Functions of Tissue Macrophages. v41. p.21-35. 2014.

EPSTEIN T., XU L., GILLIES R.J., GATENBYS R.A. Separation of metabolic supply and demand: aerobic glycolysis as a normal physiological response to fluctuating energetic demands in the membrane. **Cancer & Metabolism**. v.2. p.1-9. 2014.

FRANKLIN C., LIVINGSTONE E., ROESCH A., SCHILLING B., SCHADENDORF D. Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions. **The Journal of Cancer Surgery**. v.43. p.604-611. 2017.

FRUMAN D.A., CHIU H., HOPKINS B.D., BAGRODIAS S., CANTLEY L.C., ABRAHAM R.T. The PI3K pathway in human disease. **Cell**. v.170. p.1-62. 2018.

FU Y., LIU S., YIN S., NIU W., XIONG W., TAN M., LI G., ZHOU M., The reverse Warburg effect is likely to be an Achilles' heel of cancer that can be exploited for cancer therapy. **Oncotarget**. v8. 57813-57825. 2017.

FURTADO C.M., MARCONDES M.C., CARVALHO R.S., SOLA-PENNA M., ZANCAN P. Phosphatidylinositol-3-kinase as a putative target for anti cancer action of CTZe. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**.v.62. p. 132-141. 2015.

FURTADO C.M., MARCONDES M.C., SOLA-PENNA M., SOUZA M.L.S., ZANCAN P. CTZe Preferentially Inhibits Human Breast Cancer Cell Proliferation, Viability and Glycolysis. **Plos One**. v.7. p. 1-10. 2012.

GARBE C., EIGENTLER T.K., KEILHOLZ U., HAUSCHILD A., KIRKWOOD J.M. SysteTAMic Review of Medical Treatment in Melanoma: Current Status and Future Prospects. **The Oncologist**. v.5. p.5-24. 2011.

GAUTIER E. L., SHAY T., JENNIFER M., GRETER M., JAKUBZICK C., IVANOV S., HELFT J., CHOW A., ELPEK K.G., GORDONOV S., MAZLOOM A.R., MA'AYAN A., CHUA W.J., HANSEM. T.H., TURLEY S.J., MERAD M., RANDOLPH G. Gene expression profiles and transcriptional regulatory pathways underlying mouse tissue macrophage identity and diversity. **Nature Immunology**. v.13. p.1118–1128. 2012.

GIATROMANOLAKI A., LIOUSIA M., ARELAKI S., KALAMIDA D., POULILOU S., MITRAKAS A., TSOLOU A., SIVRIDIS E., KOUKOURAKIS M. Differential effect of hypoxia and acidity on lung cancer cell and fibroblast metabolism. **Europe PMC**. v.95. p.428-436. 2016.

GLADDEN L.B., Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. **The Journal of Physiology**. v.558. p.5-30.2004.

GRIFFITHS A.J., WESSLER F., S., CARROLL S.B., DOEBLY J. Introdução a Genética. **Guanabara** 11^a Ed. p.468-469. 2016.

GRIMALDI A.M., SIMEONE E., FESTINO L., VANELLA V., STRUDEL M., ASCIERTO P.A. MEK Inhibitors in the Treatment of Metastatic Melanoma and Solid Tumors. **American Journal of Clinical DerTAMology**. v.18. p.745-754. 2017.

GOMEZ E., KLAPPROTH K., SCHULZ C., BUSCH K., AZZONI E., CROZET L., GARNER H., TROUILLET C., BRUIJN M.F., GEISSMANN F., RODEWALD H.R. Tissue-resident macrophages originate from yolk sac-derived erythro-myeloid progenitors. **Nature**. v.518. p.547-551. 2015.

GURZU S., BELEAU M.A., JUNG I. The role of tumor microenvironment in development and progression of malignant melanomas – a systeTAMic review. **Romanian Journal of Morphology & Embryology**. v.59. p.23-28. 2018.

- GUTKNECHT M.F., BOUTON A.H. Functional significance of mononuclear phagocyte populations generated through adult hematopoiesis. **Journal of Leukocyte Biology**. v.96. p.969-980. 2014.
- HANAHAN D., WEINBERG R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**. v.144. p.646-674. 2011.
- HASHIMOTO D., CHOW A., NOIZAT C., TEO P., BEASLEY M.B., LeBOUF M., BECKER C.D., SEE P., PRICE J., LUCA D., GRETER M., MORTHA A., BOYER SW., FORSBERG E.C., TANAKA M., ROOIJEN N., SASTRE-GARCIA A., STANLEY GINHOUX F., FRENETTE P.S., MERAD M. Tissue resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. **Immunity**. v.38. p.1-25. 2013.
- HEGEMANN L., TOSO S.M., LAHIJINI K.I., WEBSTER G.F., UITTO J., Direct interaction of Antifungal Azole-Derivatives with Calmodulin: A Possible Mechanism of Their Therapeutic Activity. **The Journal of Investigative Dermatology**. v100. p.343- 346. 1993.
- HOEKSEMA M.A., GLASS C.K. Nature and nurture of tissue-specific macrophage phenotypes. **Atherosclerosis**. v.281. p.159-167.
- HOXHAIJ G., MANNING B.D. The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. **Nature Reviews**. v.20. p.74-88. 2020.
- INCA Instituto Nacional do Câncer. <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acessado em 2 de abril de 2020.
- INCA Instituto Nacional do Câncer. <https://www.inca.gov.br/como-surge-o-cancer>. Acessado em 10 de abril de 2020.
- INCA Instituto Nacional do Câncer. <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>. Acessado em 12 de abril de 2020.
- IPPOLITO L., MORANDI A., GIANNONI E., CHIARUGI P. Lactate: A Metabolic Driver in the Tumour Landscape. **Cell**. v.44. p.153-166. 2018.
- ISHIKAWA K., TAKENAGA K., AKIMOTO M., KOSHIKAWA N., YAMAGUCHI A., IMANISHI H., NAKADA K., HONNA Y., HAYASHI J.I. ROS-Generating Mitochondrial DNA Mutations Can Regulate Tumor Cell Metastasis. **Science**. v.320. p.661-664.

JHA A K., HUANG S CC., SERGUSHICHEV A., LAMPROPOULOU V., IVANOVA Y., LOGINICHEVA E., CHMIELEWSKI K., STEWART K M., ASHALL J., EVERTS B., PEARCE E J., DRIGGERS E M., ARTYOMOV M N., Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. **Immunity**. v42. 419–430. 2015.

JIA L.T., ZANHG R., SHEN L., YANG A.G. Regulators of carcinogenesis: Emerging roles beyond their primary functions. **Cancer Letters**. v.357. 75-82. 2015.

JIANG N., DAI Q., SUI X., FUI J., FENG X., PENG J., Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior. **Molecular Biology Reports**. v.47. p. 4587-4629. 2020.

JOSHI S., SINGH A R., ZULCIC M., DURDEN D., A Macrophage-Dominant PI3K Isoform Controls Hypoxia-Induced HIF1a and HIF2a Stability and Tumor Growth, Angiogenesis, and Metastasis. **Molecular Cancer Research**. v.12 p.1520-1532. 2014.

KADAVAKOLLU S., STAILEY C., KUNAPAREDDY C.S., WHITE S. CTZe as a Cancer Drug: A Short Review. **Med Chem**. v.4. p.722-724.

KANEDA, M. M., MESSER, K. S., RALAINIRINA, N., LI, H., LEEM, C. J., GORJESTANI, S., WOO, G., NGUYEN, A. V., FIGUEIREDO, C. C., FOUBERT, P., SCHMID, M. C., PINK, M., WINKLER, D. G., RAUSCH, M., PALOMBELLA, V. J., KUTOK, J., MCGOVERN, K., FRAZER, K. A., WU, X., ... VARNER, J. A. (2016). PI3K γ 3 is a molecular switch that controls immune suppression. **Nature**, v.539(7629), 437–442. 2016.

KLAUNING J.E., WANG Z., Oxidative stress in carcinogenesis. **ScienceDirect**. v.7. p.116-121. 2018.

KLOC M., GHOBRIAL R.M., WOSIK J., LEWICK A., LEWICKI S., KUBIAK J.Z. Macrophage functions in wound healing. v.13. p.99-109. 2019.

KOO S., GARG N.J. Metabolic programming of macrophage functions and pathogens control. **Redox Biology**. v.24. p.1-12. 2019.

KOPPENOL W.H., BOUNDS P.L., DANG C.V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. **Nature Reviews**. v.11. p.325-337.

LIBERTI M.V., LOCASALE J.W., The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?. **Cell Press**. v.41. p.211-218. 2016.

LIVAK K.J., SCHMITTGEN T.D., Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct Method, *Methods*, v.25, p.401-408. 2001.

LIU Y., WU K., SHI L., XIANG F., TAO K., WANG G. Prognostic Significance of the Metabolic Marker Hexokinase-2 in Various Solid Tumors: A Meta-Analysis. **Plos one**. v.11. p.1-13. 2016.

LOCASALE J.W., CANTLEY L.C. Metabolic Flux and the Regulation of Mammalian Cell Growth. **Cell Press**. v.14. p.443-451. 2011.

LÓPEZ K.G.C., MUÑOZ L.J.C., HERNÁNDEZ D.O.R., CARRANCÁ A.G., MERINO J.M. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. **Frontiers of Oncology**. v.9. p.1-21. 2019.

LUC R., TORTORELLA S.M., VERVERIS K., KARAGIANNIS T.C. Lactate as an insidious metabolite due to the Warburg effect. **Molecular Biology Reports**. v.42. p.1-6. 2015.

MACHADO, D. E. ; ALESSANDRA-PERINI, J. ; MENDONÇA, E. M. ; CLAUDINO, M. ; NASCIUTTI, L. E. ; SOLA-PENNA, M. ; ZANCAN, P. ; PERINI, J. A. . Clotrimazole reduces endometriosis and the estrogen concentration by downregulating aromatase. **Reproduction**, p. 000, 2020.

MACHADO, D. E. ; PERINI, J. A. ; MENDONÇA, E. M. ; BRANCO, J. R. ; RODRIGUES-BAPTISTA, K. C. ; ALESSANDRA-PERINI, J. ; ESPINDOLA-NETTO, J. M. ; Santos, T. A. ; Coelho, W.S. ; NASCIUTTI, L. E. ; SOLA-PENNA, M. ; ZANCAN, P. . Clotrimazole is effective for the regression of endometriotic implants in a Wistar rat experimental model of endometriosis. **Molecular and cellular endocrinology** , v. 000, p. 000, 2018.

MARCONDES M.C. ; SOLA-PENNA M. ; ZANCAN P. . Clotrimazole potentiates the inhibitory effects of ATP on the key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase. **Archives of Biochemistry and Biophysics (Print)**. v. 497, p. 62-67, 2010.

MASOUD G.N., LIN W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. v.5.p.378-389. 2015.

MAVERAKIS E., CORNELIU L.A., BOWEN G.M., PHAN T., PATEL F.B., FITZMAURICE S., HE Y., BURRAL B., DUONG C., KLOXIN A.M., SULTAN H., WILKEN .R., MARTINEZ S.R., PATEL F. Metastatic Melanoma – A Review of Current and Future Treatment Options. **Acta DerTAMo-Venereologica**. v.95. p.516-524. 2015.

MEHLA K., SINGH P.K. Metabolic Regulation of Macrophage Polarization in Cancer. **Cell press**. v.5 p.1-13. 2019.

MEMMOTT R.M., DENNIS P.A. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. **Cellular Signalling**. v.21. 656-664. 2009.

MILLER A.J., MIHM Jr M. Melanoma. **The new england journal of medicine**. v.355. p.51-65. 2006.

MINUTTI C.M., KNIPER J.A., ALLEN J., ZAISS D.W. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v.61. p.3-11. 2017.

MOSMANN T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**. v.65. p. 55-63. 1983.

MOUGIAKAKOS D., CHOUDHURY A., LIADSER A., KIESSLING R., JOHANSSON C. Regulatory T Cells in Cancer. **Advances in Cancer Research**. v.107. p.57-117. 2010.

MU X., SHI W., XU Y., XU C., ZHAO T., GENG B., YANG J., PAN J., HU S., ZHANG C., ZHANG J., WANG C., SHEN J., CHE Y., LIU Z., LY Y., WEN H., YOU Q., Tumor-derived lactate induces M2 macrophage polarization via the activation of the ERK/STAT3 signaling pathway in breast cancer. **Cell Cycle**. v.17. p.428-438. 2018.

MÜNCH N.S., FANG H.Y., INGERMAN J., MAURER H.C., ANAND A., KELLNER V., SAHM V., WIETHALER M., BAUMEISTER T., WEIN F., EINWÄCHTER., BOLZE F., KLINGENSPOR M., HALLER D., KAVANAGH M., LYSAGHT J., FRIEDMAN R., DANNENBERG A.J., POLLARK M., HOLT P.R., MUTHUPALANI S., FOX J.G., WHARY M.T., LEE Y., REN T.Y., ELLIOT R., FITZGERALD R., STEIGER K., SCHMID R. M., WANG T.C., QUANTE M. High-Fat Diet Accelerates Carcinogenesis in a Mouse Model of Barrett's Esophagus via Interleukin 8 and Alterations to the Gut Microbiome. **Gastroenterology**. v.157. p.492-506. 2019.

NAJAFI M., GORADEL N.H., FARHOOD B., SALEH E., NASHTAEI M.S., KHANLARKHANI N., KHERZRI Z., MAJIDPOOR J., ABOUZARIPOUR M., HABIBI M., KASHANI I. R.,

MORTEZAEI K. Macrophage polarity in cancer: A review. **Journal of Cellular Biochemistry**. v120. p. 1-10. 2018.

NEARY C., PASTORINO J.G. Akt inhibition promotes hexokinase 2 redistribution and glucose uptake in cancer cells†. **Journal of Cellular Physiology**. v228. p. 1943-1948. 2013.

PALCHAUDHURI R., NESTERENKO V., HERGENROTHER P.J. The Complex Role of the Triphenylmethyl Motif in Anticancer Compounds. **Journal of the American Chemical Society**. v.130. p.10274-10281.

PATHRIA P., LOUIS T.L., VARNER J.A. Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. **CellPress**. v.40. p.310-327. 2019.

PENSO J., BEITNER R. Detachment of glycolytic enzymes from cytoskeleton of Lewis lung carcinoma and colon adenocarcinoma cells induced by CTZe and its correlation to cell viability and morphology. **Molecular Genetics and Metabolism**. v76. p. 181-188. 2002.

PORTA C., PAGLINO C., MOSCA A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. **Frontier in Oncology**. v.4. p.1-11. 2014.

PUBCHEM <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/CTZe>, acessado em 11 de abril de 2020.

REDMAN J.M., GIBNEY G.T., ATKINS M.B. Advances in immunotherapy for melanoma. **BMC Medicine**. v.14. p.1-11. 2016.

SATTLER Y.G.A., MEYER S.S., QUENNET V., HOERNER C., KNOERZER H., FABIAN C., YAROMINA A., ZIPS D., WALENTA S., BAUMANN M., KLIESER W.M. Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation. **Radiotherapy and Oncology**. v.94. p.102-109. 2010.

SEMENZA G.L. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. **Curr Opin Genet Dev**. v.20. p.1-10. 2010.

SHESTOV A.A., LIU X., SER. Z., CLUNTUN A.A., HUNG Y.P., HUANG L., KIM D., LE A., YELLEN G., ALBECK J.G., LOCASALE J.W. Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step. **eLIFE**. p.1-18. 2014.

SHI X., WANG J., LEI Y., CONG C., TAN D., ZHOU X., Research progress on the PI3K/AKT signaling pathway in gynecological cancer (Review). **Molecular Medicine Reports**. v19. 4529-4535. 2019.

- SHITO L., REY S. Hypoxic Pathobiology of Breast Cancer Metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. v.1868. p.239-245. 2017.
- SICA A., MANTOVANI A., Macrophage plasticity and polarization *in vivo* veritas. **Science in medicine**. v1. 787-795. 2016.
- SUN L., CHEN B., JIANG R., LI J., WANG B., Resveratrol inhibits lung cancer growth by suppressing M2-like polarization of tumor associated macrophages. v311. 86-93. 2017.
- TAKEUCHI O., AKIRA S., Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**. v.140. p.805-820. 2010.
- TALASNIEMI J.P., PENNANEN S., SAVOLAINEN H., NISKANEN L., LIESIVUORI J. Analytical investigation: Assay of D-lactate in diabetic plasma and urine. **Clinical Biochemistry**. v.41. p.1099–1103. 2008.
- TAMEEMI W.A., DALE T.P., JUMAILY R.M.K., FORSYTH N.R. Hypoxia-Modified Cancer Cell Metabolism. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**. v.4. p.1-15. 2019.
- TARIQ M., ZHANG J., LIANG G., DING L., HE Q., YANG B., Macrophage polarization: Anti-cancer Strategies to target Tumor-associated Macrophage in Breast cancer†. **Journal of Cellular Biochemistry**. v.118. p. 2484-2501. 2017.
- WANG J., JIA L., KUANG Z., WU T., HONG Y., CHEN X., LEUNG W.K., XIA J., CHENG B. The In Vitro and *In vivo* Antitumor Effects of CTZe on Oral Squamous Cell Carcinoma. **PlosOne**. v9. p. 1-9. 2014.
- WARBURG O. the metabolism of carcinoma cells. **Cancer Research**. v.9. p.148-163. 1925.
- WELLBROCK C., AROZENA I., The Complexity of the ERK/MAP-Kinase Pathway and the Treatment of Melanoma Skin Cancer. **Frontier in Cell And Developmental Biology**. v.4. p.1-9. 2016.
- WELLEN K.E., THOMPSON C.B. A two-way street: reciprocal regulation of metabolism and signaling. **Nature reviews**. v.13. p.270-276. 2012.
- WILLIAMS G., STOEBER K. The cell cycle and cancer. **Journal of Pathology** v.226. p.352-364. 2012.
- WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Acessado em 2 de abril de 2020.

WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION <https://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/>. Acessado em 10 de abril de 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION Model List of Essential Medicines. 21list. 2019.

WOLFF M., KOSYNA F.K., DUNST J., JELKMANN W., DEPPING R. Impact of hypoxia inducible factors on estrogen receptor expression in breast cancer cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.613. p.23-30. 2017.

XIE Q., ZHU Z., HE Y., ZHANG Z., ZHANG Y., WANG Y., LUO J., PENG T., CHENG T., CHENG F., GAO J., CAO Y., WEI H., WU Z., A lactate-induced Snail/STAT3 pathway drives GPR81 expression in lung cancer cells. **BBA - Molecular Basis of Disease**. v.1866, p.1-10, 2020.

XU F., NA L., LI Y., CHEN L., Roles of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. **Cell & Bioscience**. v10. 1-12. 2020.

XUE J., SCHIMIDT S V., SANDER J., DRAFFEHN A., KREBS W., QUESTER I., DENARDO D., GOHEL T D., EMDE M., SCHIMIDLEITHNER L., GANESAN H., CASTRO A N., MALLMANN M R., LABZIN L., THEIS H., KRAUT M., BEYER M., LATZ E., FREEMAN T C., ULAS T., SCHULTZE J L., Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. **Immunity Resource CELL Press**. v.40. p.274-288. 2014.

YAMAGUCHI T., KAKEFUDA R., TAJIMA N., SOWA Y., SAKAI T. Antitumor activities of JTP-74057 (GSK1120212), a novel MEK1/2 inhibitor, on colorectal cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*. **International journal of oncology**. v.39. p.23-31. 2011.

YANG L., PANG T., MOSES H.L. TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. **Trends immunology**. v.31. p.220-227. 2010.

YARDIMICI B K., Imidazole Antifungals: A Review of Their Action Mechanisms on Cancerous Cells. **International Journal of Secondary Metabolite**. v.7. p.139-159. 2020.

YOON M S., CHOI C S., The role of amino acid-induced mammalian target of rapamycin complex 1(mTORC1) signaling in insulin resistance. **Experimental & Molecular Medicine**. v48. 1-6. 2016.

YU, H. KORTYLEWSKI M., PARDOLL D., Crosstalk between cancer and immune cells: Role of STAT3 in the tumour microenvironment. , **Nature Reviews Immunology**, v7., 41–51. 2007

ZANCAN, P.; ROSAS, A.O. ; MARCONDES, M.C. ; MARINHO-CARVALHO, M.M. ; SOLA-PENNA, M. . Clotrimazole inhibits and modulates heterologous association of the key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, p. 1520-1527, 2007.

ZHENG X., TURKOWSKI K., MORA J., BRÜNE B., SEEGER W., WEIGERT A., SAVAI R. Redirecting tumor-associated macrophages to become tumoricidal effectors as a novel strategy for cancer therapy. **OncoTarget**. v.8. p. 48436-48452. 2017.

8- Anexos

Clotrimazole presents anticancer properties against a mouse melanoma model acting as PI3K inhibitor and inducing repolarization of tumor-associated macrophages

Journal:	<i>Carcinogenesis</i>
Manuscript ID	CARCIN-2021-00136
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	30-Mar-2021
Complete List of Authors:	Ochioni, Alan; Universidade Federal do Rio de Janeiro, PPG Bioquímica Imbroisi Filho, Ricardo; Universidade Federal do Rio de Janeiro, PPG Ciências Farmacêuticas Esteves, Amanda; Universidade Federal do Rio de Janeiro, LabOMol - Faculdade de Farmácia Leandro, João; Universidade Federal do Rio de Janeiro, LabECoM Demaria, Thainá; Universidade Federal do Rio de Janeiro, LabECoM Nascimento Junior, José; Universidade Federal do Rio de Janeiro, PPG Bioquímica Pereira-Dutra, Filipe; Fundação Oswaldo Cruz, Lab Imunofarmacologia Bozza, Patricia; Institute Oswaldo Cruz, Lab Imunofarmacologia Sola-Penna, Mauro; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Biotecnologia Farmacêutica Zancan, Patricia; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Biotecnologia Farmacêutica
Keywords:	cancer, inflammation, lactate, cytotoxic, PI3K pathway

1
2
3 **Clotrimazole presents anticancer properties against a mouse melanoma model acting as**
4
5 **a PI3K inhibitor and inducing repolarization of tumor-associated macrophages**
6
7
8
9

10 Alan C. Ochioni¹, Ricardo Imbroisi Filho¹, Amanda M. Esteves¹, João G. B. Leandro², Thainá
11 M. Demaria², José Xavier do Nascimento Júnior¹, Filipe S. Pereira-Dutra³, Patricia T. Bozza³, Mauro
12 Sola-Penna² and Patricia Zancan¹
13
14
15
16
17
18
19
20

21 ¹Laboratório de Oncobiologia Molecular, Departamento de Biotecnologia Farmacêutica,
22 Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-902,
23 Brazil.
24
25

26
27 ²Laboratório de Enzimologia e Controle do Metabolismo, Departamento de Biotecnologia
28 Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ
29 21941-902, Brazil.
30
31
32
33

34
35 ³Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ,
36 CEP 21.040-900, Brazil.
37
38
39

40
41 Correspondence should be addressed to Patricia Zancan; e-mail: pzancan@me.com; phone:
42
43 + 55 21 971904494
44
45
46
47
48
49

50 **Running Title:** Clotrimazole effects on tumor microenvironment
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

The immune system is a key component of tumorigenesis, with the latter promoting the development of cancer, its progression and metastasis. In fact, abundant infiltration of tumor-associated macrophages (TAM), which are M2-like macrophages, has been associated with a poor outcome in most types of cancers. Here, we show that lactate produced by murine melanoma B16F10 cells induces an M2-like profile in cultured macrophages. Further, we demonstrate that clotrimazole (CTZ), an off-target anti-tumor drug, abolishes lactate effects on the activation of macrophages and induces the expression of M1-like markers. We show that clotrimazole has cytotoxic effects on tumor cells by negatively modulating PI3K, which inhibits glycolytic metabolism and leads to a diminishing lactate production by these cells. These effects are more pronounced in cancer cells exposed to conditioned media of M2-polarized macrophages. Moreover, clotrimazole inhibits tumor growth in a murine model of implanted melanoma, reduces lactate content in a tumor microenvironment and decreases vascular endothelial growth factor expression. Finally, clotrimazole drastically diminishes TAM infiltration in the tumors, thereby inducing M1 polarization. Collectively, these findings identify a new antitumor mechanism of clotrimazole by modulating the tumor microenvironment (TME), particularly the activation and viability of TAM.

Keywords

cancer; inflammation; lactate; PI3K pathway; cytotoxicity

Summary

This work reports the crosstalk between melanoma cancer cells and macrophages (TAM) subjected to clotrimazole treatment, using a murine tumor model and cultured cells. Clotrimazole is a PI3K inhibitor inducing cell death. Here, clotrimazole modulates macrophages infiltration, polarization and viability.

Introduction

Depending on the stimuli that are submitted, tissue-resident and circulating monocyte-derived macrophages change their basal states in a process known as activation or polarization. Phenotypically, activated macrophages are often divided into two broad categories, classically activated (M1) and alternatively activated (M2) macrophages, both characterized by specific transcriptional, morphological and secretory features (1,2). In response to inflammatory signals—such as interferon gamma (IFN γ) and lipopolysaccharide (LPS)—macrophages polarize in the classically activated, or M1, state, which is characterized by the upregulation of *Nos2* (which encodes the inducible nitric oxide synthase enzyme, iNOS) and of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin 6 (IL-6) and interleukin 12 (IL12) (3). On the other hand, alternatively activated or M2-macrophages are induced by anti-inflammatory signals—such as interleukin 4 (IL-4) and interleukin 13 (IL-13) (1), which promote the upregulation of the *Arg1*, *Mrc1* and *Cd163* genes—that are strongly associated with tissue repair processes. Although useful, this classification of

1
2
3 polarized macrophages does not consider the vast diversity of phenotypes that these cells can
4
5 acquire, particularly *in vivo* (4).
6

7
8 The tumor microenvironment (TME) consists of a complex mixture of malignantly
9
10 transformed cells, including immune cells and stromal cells, that have several functions. Among
11
12 the resident immune cells present in the TME, tumor-associated macrophages (TAM) are most
13
14 abundant and characterized as M2-like polarized macrophages. TAM quickly accumulate in the
15
16 tumors and can surpass the number of tumor cells themselves. Apart from being one of the most
17
18 common stromal cell types found in tumors, abundant infiltration of TAM has been associated
19
20 with a poor outcome in most types of cancers (5–7). TAM support tumor growth by stimulating
21
22 proliferation and survival as well as by promoting angiogenesis, tumor invasion and metastases
23
24 (8,9). In fact, the crosstalk between TAM and tumor cells is of fundamental importance for
25
26 tumorigenesis. Metabolites of each cell type can function as signals that modulate cellular
27
28 functions: for example, TAM produce and release insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in the TME,
29
30 which, in turn, stimulates phosphoinositide 3-kinase (PI3K) in tumor cells (10). On the other hand,
31
32 due to its unique metabolic profile, tumor cells secrete different effectors—such as miRNA,
33
34 protein and metabolites—that regulate the TAM function and the polarization phenotype (11).
35
36 Further, tumor cells have a highly glycolytic metabolism (the so-called Warburg effect) even in
37
38 the presence of oxygen (12), characterized by high rates of lactate production and glucose
39
40 consumption. This is because oncogenic changes can lead to the accumulation of
41
42 phosphoenolpyruvate, shunting glycolytic intermediates to anabolic pathways that allow tumor
43
44 cells to have biosynthetic intermediates essential for tumor proliferation (13,14). Consequently,
45
46 in human tumors, the levels of lactic acid are ~25 mm–30 mm (15). Moreover, an acidic and
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 nutrient-poor TME induces the immunosuppressive phenotype in macrophages. Therefore, the
4
5 metabolic state of the tumor can impact the metabolism in TAM. Thus, from a simplified
6
7 perspective, TAM favor cell proliferation and glycolysis in cancer cells that mutually determine
8
9 the functional phenotype of both cell types (9). In this context, lactate, a by-product of glycolysis
10
11 in tumor cells, has been reported as an inducer of M2 polarization of the macrophages residing
12
13 in tumors (16).
14
15
16

17
18 Among the main pathways involved in the modulation of tumor cell metabolism, we
19
20 highlight the PI3K pathway that is essential for tumor growth and survival. Moreover, PI3K and its
21
22 downstream effectors also orchestrate metabolic responses in macrophages, thereby affecting
23
24 their polarization and function (17). Our previous work has revealed that clotrimazole (CTZ) is an
25
26 antitumoral drug, as it functions as a PI3K inhibitor (18). In addition, CTZ is an imidazole derivative
27
28 that presents anti-proliferative properties (19,20). We have demonstrated that this drug directly
29
30 interferes with glycolytic enzymes, thereby inhibiting glycolysis (21–24). The deleterious effects
31
32 of CTZ are more pronounced in aggressive metastatic cancer cells than in non-metastatic cancer
33
34 cells and have minimal effects on non-tumor cells (18,21,22), as the PI3K pathway and,
35
36 consequently, glycolysis are hyperactivated in most cancers (25).
37
38
39
40
41
42

43
44 The aim of this study was to evaluate whether CTZ, acting as a PI3K inhibitor in melanoma
45
46 cells, affects the crosstalk between tumor cells and TAM. Our hypothesis is based on our previous
47
48 studies that demonstrate that CTZ negatively modulates tumor glycolytic metabolism, thereby
49
50 decreasing lactate production. In addition, we believe that a reduction in lactate levels in the TME
51
52 may affect the polarization of macrophages to TAM. Consequently, tumor growth is likely to be
53
54 impacted by CTZ treatment.
55
56
57
58
59
60

Material and methods

Cells

Mouse-derived skin melanoma cell line, B16F10, and Murine macrophages J774 and Raw 264.7 cell lines were obtained from the Cell Bank of Rio de Janeiro (BCRJ - www.bcrj.org.br, Duque de Caxias, RJ, Brazil). All cell lines were authenticated by BCRJ. All cells were grown and maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with 25 mM glucose supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 5 mM L-glutamine (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil) and 1% penicillin-streptomycin at 37°C and 5% CO₂ humidified incubator (26).

To obtain bone marrow-derived macrophage (BMDM), cells were isolated from murine femurs and tibia of male C57Bl/6 mice and cultured in RPMI1640 medium with 20% heat-inactivated FBS, 30% L929 cell-conditioned medium, 1% L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin. Differentiation was carried out in a 37°C in 5% CO₂ incubator. After seven days, adherent macrophages were harvested and seeded in plates for assays (27).

Animals, tumor-inducing and treatment

Full details on this topic are provided in Supplementary Material. Briefly, twelve seven-week-old male C57BL/6J mice were individually housed in the animal facility of the Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil. The animal protocol used for the current work was performed according to previously approved protocol by the Animal Care and Use Committee from the Health Sciences Center of the Federal University of Rio de Janeiro

1
2
3 (CEUA/CCS/UFRJ 087/16). Mice were kept on a sterilized standard rodent diet (AIN-93M,
4
5 Pragsoluções Biociências, Jaú, SP, Brazil) for two weeks to acclimate. In week 0 (nine-week-old
6
7 mice), B16F10 cells (10,000 cells in 50 μ L PBS) were subcutaneously injected in the back of mice,
8
9 forming a solid tumor with approximately $0.6 \pm 0.2 \text{ cm}^3$ after 10 days (26). On day 15, after the
10
11 induction of the tumor, the mice were randomly divided into two groups ($n = 6$) and treated daily
12
13 via orogastric with peanut oil (vehicle) or 200mg/kg CTZ (diluted in peanut oil), always at the
14
15 beginning of the light cycle. After 15 days of treatment, mice were sacrificed and the blood,
16
17 plasma, serum and major organs were collected; the tumors were immediately weighed and
18
19 frozen in liquid N_2 . Before being analyzed, tumors were crunched in liquid N_2 , and the powdered
20
21 material was stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.
22
23
24
25
26
27
28
29

30 Quantitative PCR (qPCR)

31
32 For RNA extraction, cells were seeded in six-well plates (10^5 cells/well) and grown to 70%
33
34 confluency. Then, the media were removed and cells were treated according to the experiments.
35
36 RNA extraction, cDNA synthesis and qPCR were performed as described previously (26,28).
37
38 Further details for qPCR, such as the programs used and oligos, can be found in the
39
40 Supplementary Material.
41
42
43
44
45
46

47 Western blotting

48
49 For Western blotting, cells were seeded in six-well plates (10^5 cells/well) and grown to 70%
50
51 confluency. Then, the media were removed and cells were treated according to the experiments.
52
53 Protein extraction, SDS-PAGE, transfer to nitrocellulose membranes and membranes processing
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 and incubations were performed as described previously (26). More details for Western blotting
4
5 such as complete list of the primary and secondary antibodies used are available in
6
7 Supplementary Material.
8
9

10 11 12 Cell viability assay, glucose uptake and lactate production

13
14
15 Cells were seeded in 96-well plates and grown to 70% confluence. Then, the media were
16
17 removed and fresh media were added in the presence of different concentrations of CTZ (0–50
18
19 μM). After 24 h, the media were removed and cells viability was evaluated by cell-sorting as
20
21 described previously (26).
22
23

24
25 To evaluate macrophage-conditioned medium (CM) effects on B16F10, cells were seeded
26
27 in 96-well plates in the appropriate medium and grown to 70% confluence. Then, the media were
28
29 removed, 24h Raw 264.7-CM treated (or not) with IL-4 was added, and B16F10 cells were
30
31 returned to the incubator in the presence of different concentrations of CTZ (0–50 μM). After an
32
33 additional 24h, cell viability and cell proliferation were measured as described previously (26).
34
35 More details are provided in Supplementary Material.
36
37

38
39
40 Glucose uptake was determined as previously described (18). Further details can be found
41
42 in Supplementary Material
43
44

45
46 For the determination of lactate production, the amount of lactate in the culture media
47
48 after treatment with CTZ was evaluated using a commercial kit (Labtest Diagnóstica S/A, Lagoa
49
50 Santa, MG, Brazil).
51
52

53 54 55 Mitochondrial reductive activity

56
57
58
59
60

1
2
3 Mitochondrial activity was assessed by the mitochondrial reductive potential, as
4
5 previously described (29). More details are available in Supplementary Material.
6
7
8
9

10 Enzymatic activities

11
12 The enzymatic activities were evaluated, as previously described (21), after treatment for
13
14 24 h of B16F10 cells seeded in 96-well plates and grown to 70% confluency. The cell-free
15
16 homogenates were used for evaluating the activities of the enzymes. Further details are available
17
18 in Supplementary Material.
19
20
21
22
23
24

25 Murine macrophage and bone marrow-derived macrophage polarization assays

26
27 J774 and Raw 264.7 macrophages were seeded in six-well plates (5×10^5 cells/well) in an
28
29 FBS-free medium. After 2h to allow cell attachment, the cells were treated according to the
30
31 experiments: 20 ng/mL IL-4 for polarization to M2 or 100 ng/mL LPS + 20 ng/mL IFN γ to induce
32
33 M1 polarization, and 10 mM–30 mM sodium lactate or 10 μ M CTZ. B16F10-conditioned media
34
35 (48h or 72h incubation) were also used to evaluate the polarization of macrophages. After 24h
36
37 treatment, the media were removed and protein and RNA extraction performed as described
38
39 above.
40
41
42
43
44

45 For repolarization assays with J744 cells, after the first 24h with the first inducer (IL-4 or
46
47 LPS + IFN γ), the medium was removed and a fresh medium with 30 mM sodium lactate was added
48
49 to the well. Otherwise, the former treatment was kept for 48h.
50

51 To BMDM polarization assays, 1×10^6 cell/well were plated in six-well plates. After
52
53 overnight incubation, the medium was removed and fresh medium with 10 ng/mL IL-4, 100 ng/mL
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 LPS + 20 ng/mL IFN γ and 30 mM sodium lactate or 10 μ M CTZ was added to the well. After
4
5
6 treatment for 24h, the cells were processed for protein or RNA extraction.
7
8
9

10 11 Macrophages cell viability

12
13 J774 or Raw 264.7 cells were seeded in 96-well plates in the FBS-free medium and allowed
14
15 to attach to the plate. Then, the media were removed and fresh FBS-free media was added in the
16
17 presence of different concentrations of CTZ (0 μ M–40 μ M). Raw 264.7 macrophages were
18
19 polarized with 20 ng/mL IL-4 or 100 ng/mL LPS + 20 ng/mL IFN γ for 24h prior to CTZ treatment.
20
21 After 24h with the drug, the medium was removed and MTT assay was performed as described
22
23 earlier (26,30).
24
25
26
27
28
29
30

31 Statistical analysis

32
33 All graphics and statistical analyses were performed with software Prism 8 for Mac
34
35 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Student's t-test, Mann-Whitney non-parametric test,
36
37 one-way ANOVA followed by Tukey's post-test and two-way ANOVA followed by Sidak's post-test
38
39 were used as appropriate.
40
41
42
43
44
45
46
47

48 Results

49
50
51
52 *CTZ is an anticancer drug that induces inflammation in melanoma tumors*
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 The animal protocol, described in the Material and Methods section, is summarized in
4
5 **Figure 1A**. CTZ did not interfere with mice development, like that observed by the body weight of
6
7 the animals (**Figure 1B**), and neither did it affect the serum levels of AST or ALT (**Figure 1C**),
8
9 thereby indicating that the treatment did not injure the liver of the mice. Nevertheless, CTZ
10
11 treatment seriously interfered with tumor growth, as demonstrated by tumor volume and weight,
12
13 wherein the tumors from CTZ-treated animals are half the size and weight of those from the
14
15 control group (**Figures 1D and 1E**). Since CTZ negatively modulates tumor cell metabolism, we
16
17 evaluated lactate levels in the TME. We confirm that CTZ treatment promoted a significant
18
19 decrease in the lactate content in tumors as compared with non-treated animals (**Figure 1F**).
20
21 However, the CTZ treatment did not reduce lactate dehydrogenase A (*Ldh1*) expression (**Figure**
22
23 **1G**), but even increased the expression of monocarboxylate transporter 1 (*Mct1*) (**Figure 1G**),
24
25 which is implicated in tumor development and aggressiveness (31). We have not been successful
26
27 in evaluating the enzymatic activity of LDHA in these tumors, but our previous work showed that
28
29 CTZ is able to inhibit the glycolytic pathway and, consequently, the production of lactate by tumor
30
31 cells (21,22,24), which might be the mechanism here as well.
32
33
34
35
36
37
38
39

40 Next, we examined the effects of CTZ on TME-macrophage content and polarization. Our
41
42 results revealed a robust decrease in *F4/80* expression in tumors of CTZ-treated animals as
43
44 compared to tumors from untreated animals (**Figure 1H**). This result indicates a reduction in TAM
45
46 infiltration, since this cell type is characterized by *F4/80*^{hi} expression (32). Since the number of
47
48 TAM in human tumors is correlated with higher tumor grade and shorter survival time for
49
50 different types of cancer (33,34), our data indicate an important therapeutic effect of CTZ by
51
52 reducing TAM infiltration in tumors. Moreover, in CTZ-treated-tumor-bearing animals, we
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 observed a downregulation of factors with immunosuppressive signatures: *Arg1*, *Mrc1* in addition
4
5 to *Egr2* as compared with untreated animals (**Figure 1I**). In keeping with these data, we observed
6
7 that pro-inflammatory markers—for example, *Il12b*, *Nos2*, *Fpr2*, *Ccl2* and *Tnfa*—were
8
9 upregulated upon CTZ treatment, thereby indicating the TAM repolarization process (**Figure 1I**).
10
11 Consistent with the hypothesis that CTZ promotes TAM repolarization, we tested if this drug
12
13 promotes phosphorylation of nuclear factor (NF)- κ B, thereby directly regulating the gene
14
15 expression of pro-inflammatory factors. **Figure 1J** indicates CTZ-induced NF κ B phosphorylation in
16
17 the tumors of treated animals. Moreover, the drug promoted a significant reduction in VEGF
18
19 expression (**Figure 1L**). Together, these findings indicate that CTZ inhibited the Warburg effect in
20
21 the B16F10 tumor, decreased TAM infiltration and polarization through NF κ B phosphorylation
22
23 and inhibited angiogenesis in the tumors of the treated animals. Consequently, we observed a
24
25 decrease in the proliferation of cancer cells, thereby reducing tumor growth.
26
27
28
29
30
31
32
33
34

35 *CTZ decreases B16F10 cell metabolism through PI3K inhibition*

36
37
38
39

40 In order to further investigate whether CTZ interfered with tumor growth through its effects
41
42 on cancer cells, cultured B16F10 melanoma cells were treated with different concentrations of
43
44 the drug. As depicted in **Figure 2A**, CTZ induced cell death after a 24h treatment. In addition, as
45
46 seen in previous studies with other cell types, CTZ had a devastating effect on cell viability at a
47
48 concentration of 50 μ M. Next, we measured the glucose uptake and lactate production in the
49
50 media from B16F10 cells treated with CTZ. We observed a dose-dependent response to CTZ in
51
52 both assays (**Figures 2B and 2C**). Cytochalasin B (20 μ M; CB) was used as positive control for the
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 inhibition of glucose uptake. As expected, lactate production was positively correlated with the
4
5 amount of glucose consumed by B16F10 cells.
6
7

8 Thereafter, we sought to evaluate the effects of CTZ on the rate-limiting enzymes in
9
10 glycolysis and pentose phosphate pathway (PPP). Cells were treated for 24h with CTZ and the
11
12 hexokinase (HK), phosphofructokinase (PFK), pyruvate kinase (PK) and glucose 6-phosphate
13
14 dehydrogenase (G6PDH) activities were measured. CTZ promoted a dose-dependent inhibition of
15
16 the activity of metabolic enzymes, with PK activity being the most affected (**Figure 2D**). This effect
17
18 was correlated with decreased lactate production and glucose consumption in the CTZ-treated
19
20 B16F10 cells, as described above. Given that glycolysis was inhibited by the drug, we evaluated
21
22 mitochondrial reductive activity in these cells. As depicted in **Figure 2E**, CTZ decreased
23
24 mitochondrial activity particularly in the highest concentration of the drug. Collectively, these
25
26 findings suggest that CTZ negatively modulates the metabolism of B16F10 cells, thereby inducing
27
28 cell death.
29
30
31
32
33

34
35 In order to determine whether CTZ effects glucose, the metabolism of melanoma cells were
36
37 induced by PI3K inhibition, as we have shown for other cell types (18); the insulin signaling
38
39 pathway was evaluated by Western blots. We found that CTZ inhibited AKT phosphorylation in
40
41 both residues, Thr308 and Ser473, as well as p70S6K and S6K phosphorylation, in addition to
42
43 completely abolishing the phosphorylation of Erk1/2 at the residues Thr202/Tyr204 (**Figures 2G**
44
45 **and 2H**). Together, these results support that CTZ is a PI3K inhibitor that presents more
46
47 pronounced effects on the insulin-signaling pathway than the well-known PI3K inhibitor,
48
49 LY294002, on B16F10 cells.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Our results indicated that CTZ decreases lactate production and the activation of proteins
4 related to cell proliferation in cultured B16F10 cells, thereby confirming the results obtained with
5
6 related to cell proliferation in cultured B16F10 cells, thereby confirming the results obtained with
7
8 tumor-bearing mice. Thus, we sought to assess whether factors secreted by macrophages could
9
10 modulate the response of these cells to the drug. Thus, the macrophage cell line RAW 264.7 was
11
12 treated with IL-4 to promote M2 polarization; thereafter, B16F10 cells were treated with the
13
14 conditioned media (CM) of these cells. The cytotoxic effects of CTZ on B16F10 cells were
15
16 maximized when the cells were in the presence of IL-4-treated macrophage CM (**Figure 2F**) as
17
18 compare with B16F10 cells treated with the CM from non-stimulated macrophages. As expected,
19
20 the CM from Raw 264.7 induce B16F10 cell proliferation after treatment for 24h, an effect that
21
22 tends to be more pronounced with IL-4-treated RAW 264.7 CM (**Figure 2I**).

30 *Lactate and CTZ modulate the polarization of macrophages*

31
32
33
34
35 In order to further investigate the crosstalk between tumor cells and macrophages, J774
36
37 murine macrophages were treated with CM from B16F10 cells cultured for 48h or 72h. We found
38
39 that CM from B16F10 cells treated for 72h induced the expression of *Egr2*, an M2-polarized
40
41 macrophage marker (**Figure 3B**) and did not change *Fpr2* expression—the M1 macrophage
42
43 marker. Analyzing lactate content in a B16F10-conditioned medium, we observed that there is a
44
45 correlation between *Egr2* expression by J774 cells and lactate content (**Figure 3A**). These results
46
47 are in accordance with (16). Further, in order to confirm that lactate induces the expression of
48
49 TAM or M2-like markers, we analyzed the mRNA expression of macrophage activation markers in
50
51 RAW 264.7 and J774 cells in addition to cultured BMDMs stimulated with IL-4 (anti-inflammatory
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 stimuli), LPS-IFN γ (pro-inflammatory stimuli), or lactate. Our results indicated that 30 mM lactate
4
5 increased the expression of *Egr2* and *Arg1* in murine macrophages after 24h of treatment (**Figures**
6
7 **3C and 3D**). In addition, TAM-related genes are overexpressed when BMDM were treated with
8
9 30 mM lactate or IL-4 (10 ng/mL) (**Figure 3E**).

10
11
12
13 Next, we investigated if lactate could modulate the J774 macrophage polarization process
14
15 induced by classical M1 and M2 promoters, LPS + IFN γ and IL-4, respectively. As depicted in
16
17 **Figures 3F and 3G**, lactate reverted the *Fpr2* overexpression induced by LPS + IFN γ (**Figure 3F**). On
18
19 the other hand, 30 mM lactate increased *Egr2* expression at the same level as 20 ng/mL IL-4 after
20
21 treatment for 48h. Further, sequential treatment with both M2 inducers enhanced the expression
22
23 of *Egr2* more than that in the single stimulation with IL-4 or lactate (**Figure 3G**).

24
25
26
27
28 Thereafter, we evaluated the effects of CTZ on the viability of murine macrophages. CTZ
29
30 promoted a dose-dependent decrease in cell viability in both cells (**Figure 3H**), attaining a
31
32 decrease of 45% in cell viability in 40 μ M CTZ. Interestingly, our results revealed that the drug is
33
34 more cytotoxic to macrophages polarized to the M2 subtype (**Figure 3I**). In order to determine
35
36 whether CTZ directly interferes in the polarization of macrophages, we analyzed mRNA and
37
38 protein expression in cultured RAW 264.7 cells and BMDMs stimulated with IL-4 or lactate and
39
40 treated with 10 μ M CTZ for 24h. We found similar results for both cells, where lactate induced
41
42 the expression of *Egr2* and *Arg1*, whereas CTZ promoted the expression of *Fpr2* (**Figures J and L**).
43
44 Moreover, CTZ reverted the expression of M2 markers induced by lactate in BMDM; in addition,
45
46 in Raw 264.7, we observed an increase in the M1 marker, *Fpr2*. We confirmed this last result by
47
48 analyzing the expression of iNOS, which was higher in BMDM cells co-treated with lactate and
49
50 CTZ (**Figure 3M**). Further, Western blot analysis revealed that 30 mM lactate increased the
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 expression of *Arg1*, which was reversed by treatment with 10 μ M CTZ. Finally, BMDM treated
4
5
6 with IL-4 and CTZ indicated that the drug did not revert the expression of *Arg1* induced by IL-4,
7
8 but significantly increased the expression of iNOS in this condition (grey bars, **Figure 3N**).
9

10 11 12 13 14 15 **Discussion**

16
17
18
19
20 In the present study, we evaluated the crosstalk between tumor cells and TAM by assessing
21
22 the individual response of these cells in the TME to CTZ treatment. We characterized the anti-
23
24 tumor effect of CTZ, which we have already demonstrated for breast cancer models, adding that
25
26 the drug also interferes with TME biology and function. Indeed, the drug exhibited inhibitory
27
28 function in the melanoma model by suppressing the glycolytic metabolism and, consequently,
29
30 lactate content in the TME that communicates between the TAM and cancer cells. Moreover, CTZ
31
32 significantly inhibited tumor growth parallel to decreasing F4/80 expressing cells and M2
33
34 polarization markers in tumors.
35
36
37
38
39

40 CTZ has been reported to be an anticancer agent as it modulates glycolytic enzymes (18,21–
41
42 24,35,36). Consequently, the intracellular distribution and functionality of these enzymes are
43
44 compromised, thereby resulting in decreased cell viability. Furtado et al. (2015) have shown that
45
46 CTZ is a PI3K inhibitor, an effect that is strengthened under hypoxic conditions (18). PI3K pathway
47
48 controls the metabolic adaptations to support cancer cell proliferation (37) once its activation
49
50 promotes glycolytic metabolism through AKT-mediated membrane translocation of glucose
51
52 transporters and AKT-dependent activation of HK and PFK (38,39). In this study, we confirmed
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 CTZ as a PI3K inhibitor on B16F10 melanoma cells, since the drug reduces AKT phosphorylation in
4
5 both residues (Thr308 and Ser473) in addition to promoting the inhibition of phosphorylation of
6
7 other proteins downstream in this signaling pathway, such as P70S6K and pS6. In addition, CTZ
8
9 significantly inhibits Erk1/2 phosphorylation (Thr202/Tyr204), which contributes to less
10
11 proliferation of these cells, as evident in **Figures 1D** and **1E**. These effects were observed when
12
13 B16F10 cells were treated with 10 μ M CTZ for 24h and stimulated (or not) with 100 nM Insulin
14
15 for 30 min and were similar to those observed with 0.5 μ M LY294002, a known PI3K inhibitor.
16
17 Unfortunately, we were unable to analyze the effects of CTZ on the PI3K pathway in macrophages
18
19 possibly because of the specificity of the antibodies used here and the differences in certain
20
21 phosphorylation residues or isoforms of proteins in this signaling pathway found in macrophages.
22
23 In fact, PI3K γ , the predominant PI3K isoform expressed in myeloid cells, is activated by various
24
25 chemoattractants. PI3K γ is abundantly expressed in myeloid cells but not in cancer cells (40) and
26
27 promotes myeloid cell trafficking during inflammation and cancer (41). Moreover, its inhibition
28
29 does not directly affect the growth or survival of tumor cells, which do not express this kinase
30
31 (42). Nevertheless, PI3K γ is also associated with macrophage-mediated anti-inflammatory
32
33 responses. Indeed, although PI3K γ inhibition does not alter the accumulation of TAM in tumors,
34
35 it promotes the expression of pro-inflammatory cytokines and inhibits the expression of factors
36
37 that suppress the immune system in tumors and TAM, thereby indicating that this kinase is able
38
39 to regulate whether TAM will have immune-suppressing or immune-stimulating activity (41).
40
41 Thus, therapies targeting the inhibition of PI3K γ , among other proteins, reduce the infiltration of
42
43 myeloid cells in tumors as well as decrease tumor growth and metastasis in different tumors (43).
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 This could explain the CTZ effects presented in the current study on TME and cultured
4
5
6 macrophages.

7
8 We also evaluated the response of B16F10 to chemotherapy with CTZ when these cells were
9
10 exposed to murine macrophage-conditioned medium treated with IL-4, which induces TAM-like
11
12 activation, as previously described (44). In addition to favoring cell growth after only 24h of
13
14 incubation, our results indicated that tumor cells exposed to the CM of the M2 polarized
15
16 macrophages are more sensitive to the effects of CTZ on cell viability. These data suggest that CTZ
17
18 has more pronounced cytotoxic effects on tumor cells when they are stimulated with products
19
20 from the M2-macrophages cell metabolism. These assays were also performed in melanoma cells
21
22 that were directly treated with IL-4. However, we did not observe any significant differences in
23
24 these conditions, discarding the putative effect of IL-4 reminiscent from the M2 polarization of
25
26 macrophages (data not shown). This result is of particular importance, since TME is full to TAM
27
28 (45). As discussed above, clinically, the more the extent of TAM infiltration in tumors, the worse
29
30 is the prognosis. Therefore, a drug whose cytotoxicity is driven towards cancer cells exposed to
31
32 TAM metabolites would be more effective the more aggressive the tumor is. This statement is
33
34 corroborated by our previous studies where we show that CTZ presents selectivity to the more
35
36 aggressive cancer cells, being almost ineffective to non-tumor cells (18,21,46).
37
38
39
40
41
42
43
44

45 Cancer cells, but not macrophages, significantly increase lactate levels and decrease glucose
46
47 levels in the culture medium after 24h of growth even in the presence of oxygen, thereby
48
49 highlighting the importance of aerobic glycolysis for tumor cells (15,47). The lactate levels
50
51 reported in human tumors and produced by cancer cells in culture are approximately 25 mM–30
52
53 mM (16). Our results confirmed the data given by Colegio et al. (48) and revealed that the CM
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 from B16F10 induces the polarization of cultured macrophages to an M2-like profile. Moreover,
4
5 lactate reverses the expression of the M1 marker, *Fpr2*, induced by LPS+IFN γ and potentiates the
6
7 expression of the M2 marker, *Egr2*, stimulated by IL-4. These data reinforce the importance of
8
9 tumor lactate as a paracrine modulator of TAM metabolism (16). It is important to highlight that
10
11 we ensured that we used different cell lines, in addition to macrophages in primary culture,
12
13 thereby seeking to mimic as much as possible the diversity of myeloid cells that could be present
14
15
16
17
18 in TME.

19
20 Further, the data presented in this study suggested that CTZ induces M1 activation in both
21
22 cells, Raw 264.7 and BMDM. Beyond that, CTZ reverted M2-polarization induced by lactate and
23
24 induced *Fpr2* expression presenting particular effects on each cell, but this confirms, globally, an
25
26 antitumor action of the drug. Perhaps, more importantly, the repolarization of TAM to a
27
28 phenotype similar to M1 macrophages generates expressive antitumor responses in pre-clinical
29
30 murine models (1,49). These results were confirmed by WB analysis, where CTZ induced iNOS
31
32 expression in BMDM co-treated with lactate or IL-4 and CTZ. Finally, we reinforced that lactate,
33
34 as well as IL-4, induces *Arg1* protein expression in macrophages, which is partially prevented by
35
36 CTZ when induced by lactate but not inhibited by CTZ treatment in IL-4 stimulated cells.
37
38
39
40
41

42
43 In conclusion, we confirmed that the polarization of tumor-derived lactate modulates
44
45 macrophages induced M2-like features, *Arg1* expression and other M2-associated genes in TAM.
46
47 However, depletion or TAM repolarization in tumors is a promising therapeutic strategy (41). In
48
49 fact, our data revealed that decreasing TAM infiltration and promoting M1-like polarization were
50
51 associated with reduced tumor burden in CTZ-treated mice. Moreover, these CTZ effects on
52
53 macrophages might potentially enhance T-cell-mediated anti-tumoral responses and improve
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 immunotherapy efficacy (50). The mechanisms involved in lactate-induced M2 polarization still
4
5 remain to be elucidated. However, our results clearly indicate that CTZ might present promising
6
7 anticancer effects on melanoma cells by simultaneously interfering with TAM polarization and
8
9 the biology of cancer cells.
10
11
12
13
14
15
16
17

18 **Data Availability**

19
20
21
22
23 The data used to support the findings of this study are available from the corresponding
24
25 authors upon request.
26
27
28
29
30
31

32 **Conflicts of Interest**

33
34
35
36
37 The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this
38
39 paper.
40
41
42
43
44

45 **Supplementary Material**

46
47 Supplementary material to Material and Methods can be found at
48
49 <http://carcin.oxfordjournals.org/>
50
51
52
53

54 **Funding Statement**

55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6 This work was supported by grants from Programa de Oncobiologia/Fundação do Câncer,
7
8 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de
9
10 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Conselho Coordenação de
11
12 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Moreover, the authors wish to remark
13
14 about the clear contribution of the Brazilian Government in destroying the R&D horizon of Brazil
15
16 and the future of an entire generation.
17
18
19
20
21
22
23
24

25 **Acknowledgments**

26
27
28
29
30 The authors thank Prof. João Viola (INCa) and Prof. João Alfredo de Moraes (ICB- UFRJ),
31
32 who kindly provided analytical tools.
33
34
35
36
37
38
39

40 **References**

- 41
42
43
44
45 1. Mantovani, A. *et al.* Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. ,
46
47 *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14. 01-Jul-(2017) , Nature Publishing Group, 399–416.
48
49
50 2. Murray, P.J. Macrophage Polarization. , *Annual Review of Physiology*, 79. 10-Feb-(2017) ,
51
52 Annual Reviews Inc., 541–566.
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 3. Murray, P.J. *et al.* Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and
4
5 Experimental Guidelines. , *Immunity*, 41. 17-Jul-(2014) , Cell Press, 14–20.
6
7
- 8 4. Xue, J. *et al.* (2014) Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of
9
10 Human Macrophage Activation. *Immunity*, **40**, 274–288.
11
12
- 13 5. Mantovani, A. *et al.* (2008) Cancer-related inflammation. *Nature*, **454**, 436–444.
14
- 15 6. Nonomura, N. *et al.* (2011) Infiltration of tumour-associated macrophages in prostate
16
17 biopsy specimens is predictive of disease progression after hormonal therapy for prostate
18
19 cancer. *BJU International*, **107**, 1918–1922.
20
21
- 22 7. Zhang, Q. wen *et al.* (2012) Prognostic Significance of Tumor-Associated Macrophages in
23
24 Solid Tumor: A Meta-Analysis of the Literature. *PLoS ONE*, **7**,
25
26
- 27 8. Cassetta, L. *et al.* Targeting macrophages: Therapeutic approaches in cancer. , *Nature*
28
29 *Reviews Drug Discovery*, 17. 28-Nov-(2018) , Nature Publishing Group, 887–904.
30
31
- 32 9. Netea-Maier, R.T. *et al.* Metabolic changes in tumor cells and tumor-associated
33
34 macrophages: A mutual relationship. , *Cancer Letters*, 413. 28-Jan-(2018) , Elsevier Ireland
35
36 Ltd, 102–109.
37
38
- 39 10. Quail, D.F. *et al.* (2016) The tumor microenvironment underlies acquired resistance to
40
41 CSF-1R inhibition in gliomas. *Science*, **352**,
42
43
- 44 11. Han, C. *et al.* (2021) Exosome-mediated communication between tumor cells and tumor-
45
46 associated macrophages: implications for tumor microenvironment. DOI:
47
48 10.1080/2162402X.2021.1887552.
49
50
- 51 12. Dang, L. *et al.* (2009) Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate.
52
53
54
55
56
57
58
59
60 *Nature*, **462**, 739–744.

- 1
2
3 13. Heiden, M.G.V. *et al.* Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of
4 cell proliferation. , *Science*, 324. 22-May-(2009) , 1029–1033.
5
6
- 7
8 14. Pavlova, N.N. *et al.* The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. , *Cell Metabolism*,
9 23. 12-Jan-(2016) , Cell Press, 27–47.
10
11
- 12
13 15. Walenta, S. *et al.* (2000) High Lactate Levels Predict Likelihood of Metastases, Tumor
14 Recurrence, and Restricted Patient Survival in Human Cervical Cancers. *Cancer Research*,
15 **60**,
16
17
- 18
19
20 16. Colegio, O.R. *et al.* (2014) Functional polarization of tumour-associated macrophages by
21 tumour-derived lactic acid. *Nature*, **513**, 559–563.
22
23
- 24
25 17. Sharif, O. *et al.* Macrophage rewiring by nutrient associated PI3K dependent pathways. ,
26 *Frontiers in Immunology*, 10. 21-Aug-(2019) , Frontiers Media S.A., 2002.
27
28
- 29
30 18. Furtado, C.M. *et al.* (2015) Phosphatidylinositol-3-kinase as a putative target for
31 anticancer action of clotrimazole. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*,
32 **62**, 132–141.
33
34
- 35
36
37 19. Kadavakollu, S. *et al.* (2014) Clotrimazole as a Cancer Drug: A Short Review. *Medicinal*
38 *chemistry*, **4**, 722–724.
39
40
- 41
42 20. Humayun Khalid, M. *et al.* (2005) *Inhibition of tumor growth and prolonged survival of*
43 *rats with intracranial gliomas following administration of clotrimazole*, 103
44
45
- 46
47 21. Furtado, C.M. *et al.* (2012) Clotrimazole preferentially inhibits human breast cancer cell
48 proliferation, viability and glycolysis. *PLoS ONE*, **7**,
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
22. Coelho, R.G. *et al.* (2011) Clotrimazole disrupts glycolysis in human breast cancer without affecting non-tumoral tissues. *Molecular Genetics and Metabolism*, **103**, 394–398.
 23. Marcondes, M.C. *et al.* (2010) Clotrimazole potentiates the inhibitory effects of ATP on the key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **497**, 62–67.
 24. Zancan, P. *et al.* (2007) Clotrimazole inhibits and modulates heterologous association of the key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase. *Biochemical Pharmacology*, **73**, 1520–1527.
 25. Okkenhaug, K. *et al.* Targeting PI3K in cancer: Impact on tumor cells, their protective stroma, angiogenesis, and immunotherapy. , *Cancer Discovery*, 6. 01-Oct-(2016) , American Association for Cancer Research Inc., 1090–1105.
 26. Ausina, P. *et al.* (2020) Acetylsalicylic acid and salicylic acid present anticancer properties against melanoma by promoting nitric oxide-dependent endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Scientific Reports*, **10**,
 27. Souza-Moreira, L. *et al.* (2019) Adipose-derived Mesenchymal Stromal Cells Modulate Lipid Metabolism and Lipid Droplet Biogenesis via AKT/mTOR –PPAR γ Signalling in Macrophages. *Scientific Reports*, **9**,
 28. Sola-Penna, M. *et al.* (2020) Serotonin activates glycolysis and mitochondria biogenesis in human breast cancer cells through activation of the Jak1/STAT3/ERK1/2 and adenylate cyclase/PKA, respectively. *British Journal of Cancer*, **122**, 194–208.

- 1
2
3 29. Sola-Penna, M. *et al.* (2020) Serotonin activates glycolysis and mitochondria biogenesis
4 in human breast cancer cells through activation of the Jak1/STAT3/ERK1/2 and adenylate
5 cyclase/PKA, respectively. *British Journal of Cancer*, **122**, 194–208.
6
7
8
9
10 30. Branco, J.R. *et al.* (2018) A Novel Naphthotriazolyl-4-oxoquinoline Derivative that
11 Selectively Controls Breast Cancer Cells Survival Through the Induction of Apoptosis.
12 *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **18**, 1465–1474.
13
14
15
16
17 31. Payen, V.L. *et al.* Monocarboxylate transporters in cancer. , *Molecular Metabolism*, 33.
18 01-Mar-(2020) , Elsevier GmbH, 48–66.
19
20
21
22 32. Tymoszuk, P. *et al.* (2014) In situ proliferation contributes to accumulation of tumor-
23 associated macrophages in spontaneous mammary tumors. *European Journal of*
24 *Immunology*, **44**, 2247–2262.
25
26
27
28
29 33. Hu, Y. *et al.* (2016) Tumor-associated macrophages correlate with the clinicopathological
30 features and poor outcomes via inducing epithelial to mesenchymal transition in oral
31 squamous cell carcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, **35**,
32
33
34
35
36
37 34. Zhang, W. jie *et al.* (2018) Tumor-associated macrophages correlate with phenomenon
38 of epithelial-mesenchymal transition and contribute to poor prognosis in triple-negative
39 breast cancer patients. *Journal of Surgical Research*, **222**, 93–101.
40
41
42
43
44 35. Glass-Marmor, L. *et al.* (1997) Detachment of glycolytic enzymes from cytoskeleton of
45 melanoma cells induced by calmodulin antagonists. *European Journal of Pharmacology*,
46 **328**, 241–248.
47
48
49
50
51 36. Rodríguez-Enríquez, S. *et al.* Targeting of cancer energy metabolism. , *Molecular*
52 *nutrition & food research*, 53. (2009) , Mol Nutr Food Res, 29–48.
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
37. Cantor, J.R. *et al.* Cancer cell metabolism: One hallmark, many faces. , *Cancer Discovery*, 2. Oct-(2012) , *Cancer Discov*, 881–898.
38. Deprez, J. *et al.* (1997) Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 17269–17275.
39. Gottlob, K. *et al.* (2001) Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes and Development*, **15**, 1406–1418.
40. Schmid, M.C. *et al.* (2011) Receptor tyrosine kinases and TLR/IL1Rs Unexpectedly activate myeloid cell PI3K γ , A single convergent point promoting tumor inflammation and progression. *Cancer Cell*, **19**, 715–727.
41. Kaneda, M.M. *et al.* (2016) PI3K γ 3 is a molecular switch that controls immune suppression. *Nature*, **539**, 437–442.
42. Evans, C.A. *et al.* (2016) Discovery of a Selective Phosphoinositide-3-Kinase (PI3K)- γ Inhibitor (IPI-549) as an Immuno-Oncology Clinical Candidate. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **7**, 862–867.
43. Schmid, M.C. *et al.* (2011) Combined blockade of integrin- α 4 β 1 plus cytokines SDF-1 α or IL-1 β potently inhibits tumor inflammation and growth. *Cancer Research*, **71**, 6965–6975.
44. Jha, A.K. *et al.* (2015) Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity*, **42**, 419–430.

- 1
2
3 45. Noy, R. *et al.* Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. ,
4
5
6 *Immunity*, 41. 17-Jul-(2014) , Cell Press, 49–61.
7
8 46. Marcondes, M.C. *et al.* (2015) Nanomicellar formulation of clotrimazole improves its
9
10 antitumor action toward human breast cancer cells. *PLoS ONE*, **10**,
11
12
13 47. Carmona-Fontaine, C. *et al.* (2013) Emergence of spatial structure in the tumor
14
15 microenvironment due to the Warburg effect. *Proceedings of the National Academy of*
16
17 *Sciences of the United States of America*, **110**, 19402–19407.
18
19
20 48. Yu, H. *et al.* Crosstalk between cancer and immune cells: Role of STAT3 in the tumour
21
22 microenvironment. , *Nature Reviews Immunology*, 7. Jan-(2007) , 41–51.
23
24
25 49. Hughes, R. *et al.* (2015) Perivascular M2 macrophages stimulate tumor relapse after
26
27 chemotherapy. *Cancer Research*, **75**, 3479–3491.
28
29
30 50. Sun, L. *et al.* (2017) Resveratrol inhibits lung cancer growth by suppressing M2-like
31
32 polarization of tumor associated macrophages. *Cellular Immunology*, **311**, 86–93.
33
34
35
36
37
38
39

40 **Figure legends**

41
42
43
44
45 **Figure 1.** Anticancer and immunosuppressive effects of CTZ on a murine model of implanted
46 melanoma. Panel **A**: the animal protocol design. Panel **B**: average values for the mice body weight
47
48 at the end of the experiment (mean \pm SEM; n = 6). Panel **C**: average values for the activity of the
49
50 liver enzymes AST and ALT in the serum of the animals (mean \pm SEM; n = 6). Panel **D**: picture of
51
52 representative tumors extracted from untreated animals and those treated with CTZ. Panel **E**:
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 scatter plot of tumors weight, comparing the control with CTZ treatment (bar and error bars in
4 each scatter plot are mean \pm SEM; n = 6). * indicates $p < 0.05$ as compared to control (Student's
5 t-test). Panel F: lactate content in tumors. Bars are mean \pm S.E.M. of six different animals in each
6 group (n = 6). * indicates $p < 0.05$ as compared to control (Student's t-test). Panel G: relative
7 mRNA expression of lactate dehydrogenase A (*Ldh1*) and monocarboxylate transporter (*Mct1*)
8 from tumor tissues measured by qPCR analysis (bars are mean $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm$ SEM; n = 6; * P < 0.05,
9 Mann-Whitney non-parametric test as compared to control). Panel H: relative mRNA expression
10 of macrophage surface marker F4/80 (*Adgre1*) from tumor tissues measured by qPCR analysis
11 (bars are mean $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm$ SEM; n = 6; * P < 0.05, Mann-Whitney non-parametric test as compared
12 to control). Panel I: relative mRNA expression of immune response genes (*Nos2*, *Fpr2*, *Tnfa*, *Il12b*,
13 *Ccl2*, *Il1b*, *Arg1*, *Egr2* and *Mrc1*) from tumor tissues measured by qPCR analysis (bars are mean $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm$
14 SEM; n = 6; * P < 0.05, Mann-Whitney non-parametric test as compared to control). Panel
15 J: Western blot analysis of proteins associated with tumor' inflammatory response: pNF κ B
16 (Ser536) and NF κ B were quantified using the ImageJ software and the quantification of each
17 staining is plotted in the panels normalized by the quantification of the total protein staining (bars
18 are mean \pm SEM, n = 3, * P < 0.05, Student's t-test). Panel L: Western blot analysis of VEGF
19 quantified using the ImageJ software and the quantification of each staining is plotted in the
20 panels normalized by the quantification of β -actin staining (bars are mean \pm SEM, n = 3, * P <
21 0.05, Student's t-test).

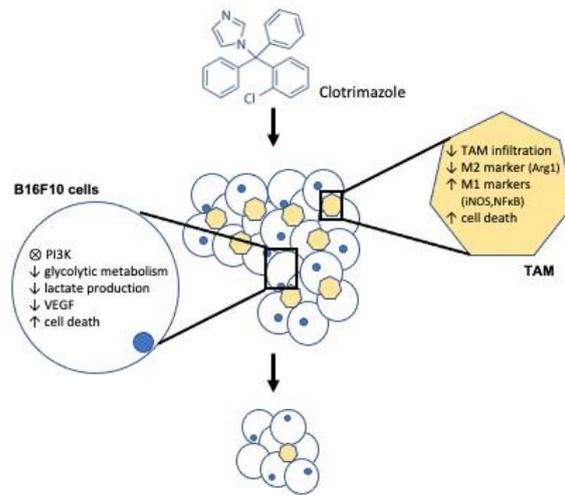
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Figure 2. Cytotoxic and metabolic effects of CTZ on B16F10 melanoma cells. B16F10 cells were treated with different CTZ concentrations (0 μ M–50 μ M) for 24h. Panel A: cell viability. Panel B:

1
2
3 glucose uptake. 20 μ M cytochalasin B (CB) was used as a positive control for glucose uptake
4
5
6 inhibition. Panel **C**: lactate production. Panel **D**: enzymatic activity of HK, PFK, PK, and G6PDH.
7
8 Panel **E**: mitochondrial activity. These plotted values are the mean \pm S.E.M. of three independent
9
10 experiments (n = 3). For A, B, C and E, the data were analyzed using one-way ANOVA, followed by
11
12 Tukey's post-test; * indicates P < 0.05 compared with the control of the same group. Panel **F**:
13
14 number of B16F10 viable cells treated for 24h with Raw 264.7 CM treated (or not) with 20 ng/mL
15
16 IL-4 during 24h. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's post-test; *
17
18 indicates P < 0.05 compared with the control of the same group. Panel **G**: Representative Western
19
20 blot of total and phosphorylated AKT, p70S6K, S6 and ERK1/2. Insulin signaling was analyzed by
21
22 Western blots in B16F10 lysates treated with 10 μ M CTZ or 0.5 μ M LY294002 for 24h stimulated
23
24 (or not) with 100 nM insulin for 30 min. Panel **H**: upper panel: pAKT (Thr308)/AKT, pAKT
25
26 (Ser473)/AKT, bottom panel: p-p70S6K (Thr421/Ser424)/GAPDH, pS6 (Ser235/236)/GAPDH and
27
28 pERK1/2 (Thr202/Tyr204)/ERK1/2 were quantified using the ImageJ software and the
29
30 quantification of each staining is plotted in the panels normalized by the quantification of the
31
32 total protein staining. GAPDH was used as the loading control. Values are mean \pm S.E.M. of three
33
34 independent animals (n = 3); * indicates P < 0.05 as compared to control (two-way ANOVA,
35
36 followed by Tukey's post-test). Panel **I**: B16F10 cell proliferation evaluated by the number of
37
38 viable cells in the same condition presented in Panel F (for statistics, two-way ANOVA followed
39
40 by Tukey's post-test was applied).
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51

52 **Figure 3.** Lactate and CTZ effects on macrophage polarization. Panel **A**: lactate production by
53
54 B16F10 cells after incubation for 48h and 72h. Panel **B**: relative mRNA expression of M1
55
56
57
58
59
60

1
2
3 polarization marker (*Fpr2*) and M2 polarization marker (*Egr2*) assessed by qPCR (n = 3). J774 cells
4
5 were incubated with B16F10 CM described in Panel A. CFM: cell free medium. Panel **C**: relative
6
7 mRNA expression of *Fpr2* and *Egr2* in Raw 264.7 cells treated with 100 ng/mL LPS + 20 ng/mL
8
9 IFN γ , 20 ng/mL IL-4 or 10-30 mM sodium lactate for 24h assessed by qPCR (n = 3). Panel **D**: relative
10
11 Arg1 mRNA expression in J774 and Raw 264.7 cells treated (or not) with 30 mM sodium lactate
12
13 assessed by qPCR (n = 3). Panel **E**: relative mRNA expression of *Fpr2*, *Egr2*, and *Arg1* in BMDM
14
15 treated with 100 ng/mL LPS + 20 ng/mL IFN γ , 10 ng/mL IL-4 or 30 mM sodium lactate for 24h
16
17 assessed by qPCR (n = 3). Panels **F** and **G**: relative mRNA expression of *Fpr2* or *Egr2* in J774 treated
18
19 as described in the Material and Methods section and assessed by qPCR (n = 3). Panel **H**: cell
20
21 viability of J774 and Raw 264.7 measured by MTT after CTZ treatment for 24h (n = 3). Panel **I**:
22
23 polarized Raw264.7 cell viability after CTZ treatment, as described in the Material and Methods
24
25 section (n = 3). Panel **J** and **L**: macrophage repolarization assay after 30 mM sodium lactate and/or
26
27 10 μ M CTZ incubation. * indicates P < 0.05 as compared to control (Mann-Whitney test) for all
28
29 qPCR plots. Panel **M** and **N**: Western blot of protein extract from BMDM treated with 10 ng/mL
30
31 IL-4 or 30 mM sodium lactate and/or 10 μ M CTZ, as described in the Material and Methods
32
33 section. Bottom plots: densitometric quantification of Western blots; bar graphs represent
34
35 averaged quantifications of immunoblots from at least three-independent experiments. *
36
37 indicates P < 0.05 as compared to control for the same protein and # indicates P < 0.05 as between
38
39 the conditions marked (Student's t-test).
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Graphic abstract

190x275mm (72 x 72 DPI)

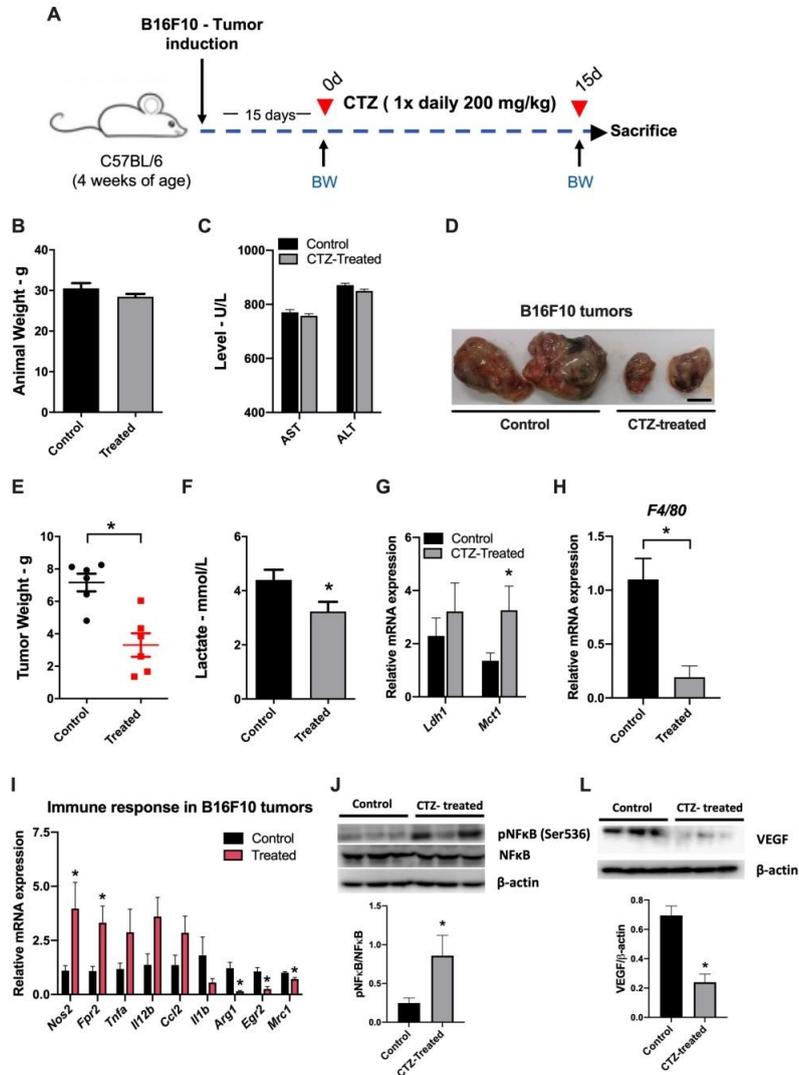


Figure 1

182x240mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

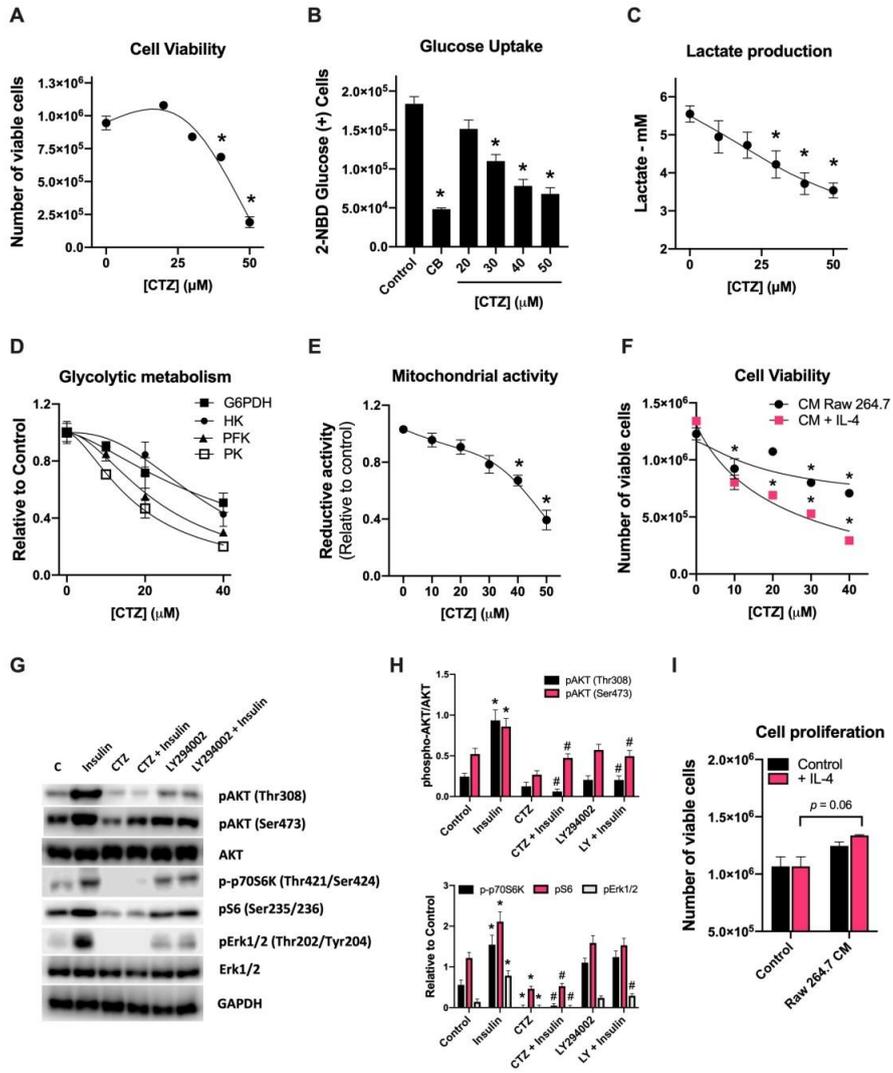


Figure 2

189x226mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

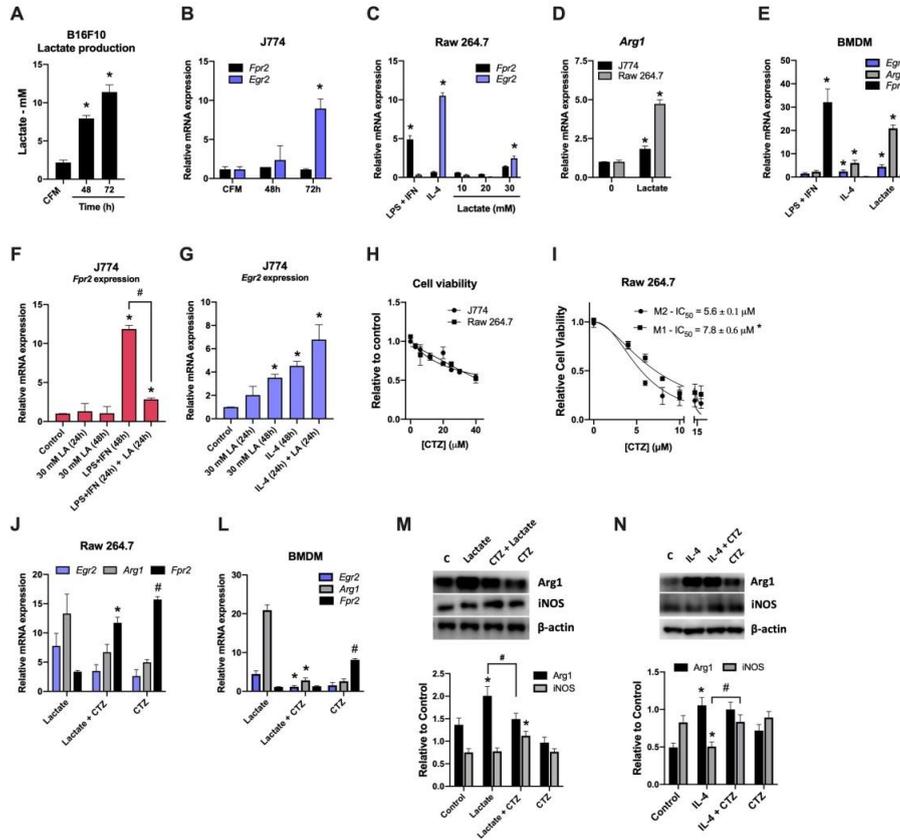


Figure 3

206x193mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Supplementary Material**Clotrimazole presents anticancer properties against a mouse melanoma model acting as a PI3K inhibitor and inducing repolarization of tumor-associated macrophages**

Alan C. Ochioni¹, Ricardo Imbroisi Filho¹, Amanda M. Esteves¹, João G. B. Leandro², Thainá M. Demaria², José Xavier do Nascimento Júnior¹, Filipe S. Pereira-Dutra³, Patricia T. Bozza³, Mauro Sola-Penna² and Patricia Zancan¹

¹ Laboratório de Oncobiologia Molecular, Departamento de Biotecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil.

² Laboratório de Enzimologia e Controle do Metabolismo, Departamento de Biotecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil.

³ Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, CEP 21.040-900, Brazil.

Correspondence should be addressed to Patricia Zancan; e-mail: pzancan@me.com; phone: + 55 21 971904494

Materials and Methods

Animals, tumor-inducing and treatment

Twelve seven-week-old male C57BL/6J mice were individually housed under a controlled temperature (23°C) and 12/12 hours daylight cycle (lights off at 18:00) with water and food *ad libitum* in the animal facility of the Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil. The animal protocol used for the current work was performed according to previously approved protocol by the Animal Care and Use Committee from the Health Sciences Center of the Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/CCS/UFRJ 087/16). Mice were kept on a sterilized standard rodent diet (4.4% fat by kcal, total 3.6 kcal/g of diet, AIN-93M, Pragsoluções Biociências, Jaú, SP, Brazil) for two weeks to acclimate. In week 0 (nine-week-old mice), B16F10 cells (10,000 cells in 50 µL PBS) were subcutaneously injected in the back of mice, forming a solid tumor with approximately $0.6 \pm 0.2 \text{ cm}^3$ after 10 days (1). On day 15, after the induction of the tumor, the mice were randomly divided into two groups (n = 6) and treated daily via orogastric with peanut oil (vehicle) or 200mg/kg CTZ (diluted in peanut oil), always at the beginning of the light cycle. After 15 days of treatment, mice were sacrificed and the blood, plasma, serum and major organs were collected; the tumors were immediately weighed and frozen in liquid N₂. Before being analyzed, tumors were crunched in liquid N₂, and the powdered material was stored at -80 °C and used for lactate quantification, Western blotting and qPCR analyses. The serum levels of aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) were evaluated using commercial kits, according to the manufacturer's instructions (Doles Reagentes, Panamá, GO, Brazil).

1
2
3 Further, the tumor lactate content was evaluated by using a commercial kit (Labtest
4
5
6 Diagnóstica S/A, Lagoa Santa, MG, Brazil). Briefly, 40 mg of powdered tumor material was
7
8 dissolved in 0.1 mL RIPA buffer and sample analysis was performed according to the
9
10 manufacturer's instructions.
11

12 13 14 15 Quantitative PCR (qPCR)

16
17 For RNA extraction, cells were seeded in six-well plates (10^5 cells/well) and grown to 70%
18
19 confluency. Then, the media were removed and cells were treated according to the experiments.
20
21 After the treatments, the media were removed again and 500 μ l of Trizol reagent
22
23 (ThermoFischer, Carlsbad, CA, USA) was added to each well, followed by homogenization by up
24
25 and down pipetting. Thereafter, RNA extraction was performed following the directions of the
26
27 reagent. The same procedure was performed with powdered tumor samples.
28
29
30

31
32 For cDNA synthesis, the High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFischer, Carlsbad,
33
34 CA, USA) was used. For qPCR, the dye-based GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Fitchburg, WI,
35
36 USA) or the probe-based TaqMan Universal Master Mix II with UNG (ThermoFischer, Carlsbad,
37
38 CA, USA) were used depending on the oligo pairs selection. All reactions were performed
39
40 according to the Master Mix manufacturer's directions in a QuantStudio 5 apparatus
41
42 (ThermoFischer, Carlsbad, CA, USA). The program for dye-based amplifications was 2 min at 95°C
43
44 followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C; moreover, a dissociation curve was
45
46 performed at the end of the experiment and the dissociation peak was analyzed. For probe-based
47
48 amplifications, the program was 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at
49
50
51
52
53
54
55 95°C and 1 min at 60°C. The relative mRNA expression was calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, as
56
57
58
59
60

1
2
3 described previously (2). Cyclophilin A (*Ppia*) or b-actin (*Actinb*) expression were used as
4
5
6 reference genes (housekeeper) since their expression did not vary upon any of the used
7
8 treatments (data not shown). The probe-based oligos were all Predesigned Taqman Gene
9
10 Expression Assays (ThermoFischer, Carlsbad, CA, USA): *Nos2* (ref: Mm00440502_m1 FAM), *MRC1*
11
12 (ref: Mm01329362_m1, FAM), *TNF α* (ref: Mm00443258_m1, FAM), *CCL2* (ref: Mm00441242_m1,
13
14 FAM), *IL-1b* (ref: Mm00434228_m1, FAM), β -actin (Mm02619580_g1, VIC). *Ppia* primers were as
15
16 previously published (2). All other primers were designed using Primer-blast tool 22 and all qPCR
17
18 conditions were optimized following international standards (3,4). The following designed
19
20 primers were utilized: *EGR2* forward primer: 5'-GTGGCGGGAGATGGCATGAT-3' reverse primer:
21
22 5'-TCGGATACGGGAGATCCAGG-3 (amplicon: 70bp; efficiency: 97%); *ARG1* forward primer: 5'-
23
24 GGTCTCTCACGTCATACTCTGTTT-3'; reverse primer: 5'-CCTCGAGGAGGGGTAGAGAAA-3
25
26 (amplicon: 91bp; efficiency: 102%); F4/80 forward primer: 5'-CCGTCAGGTACGGGATGAAT-3';
27
28 reverse primer: 5'-AGAAGTCTGGGAATGGGAGC-3' (amplicon: 73bp; efficiency: 97%); LDH1
29
30 forward primer: 5'-TGGGGTTGGTGCTGTTGGA-3'; reverse primer: 5'-
31
32 GGAAGAGGCTGCCATGCTGA-3' (amplicon: 137bp; efficiency: 101%); *FPR2* forward primer: 5'-
33
34 CCAGTGATTCAAGCACCAGT-3'; reverse primer: 5'-TCACAGACTTCATGGGCCTT-3' (amplicon:
35
36 71bp; efficiency: 99%); *IL-12b* forward primer: 5'-GCAGCAAAGCAAGATGTGTCC-3'; and reverse
37
38 primer: 5'-TGGAGACACCAGCAAACGA-3' (amplicon: 70pb; efficiency: 96%).
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 Western blotting

51
52 For Western blotting, cells were seeded in six-well plates (10^5 cells/well) and grown to
53
54 70% confluency. Then, the media were removed and cells were treated according to the
55
56
57
58
59
60

1
2
3 experiments. After the treatments, the media were removed again and a mild-RIPA buffer
4
5
6 supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added for
7
8 total protein extraction. Tumor protein extraction was also performed with mild-RIPA buffer (1).
9
10 Protein extracts were submitted to SDS-PAGE (8% gels), followed by overnight transfer to
11
12 nitrocellulose membranes at 30 V. Membranes were stained with Ponceau S, processed by
13
14 precutting the blots and de-stained by washing with distilled water. Then, the precut membranes
15
16 were incubated overnight with the following antibodies: anti- β -actin (dilution 1:1000, Cat# 4967,
17
18 Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-Akt (dilution 1:1000, Cat# 9272, Cell Signaling
19
20 Technology, Danvers, MA, USA), anti-phospho-Akt (Thr308) (dilution 1:1000, Cat# 9275, Cell
21
22 Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-phospho-Akt (Ser473) (dilution 1:1000, Cat# 9271,
23
24 Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-phospho-p70S6k (Thr421/Ser424) (dilution
25
26 1:1000, Cat# 9204, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-phospho-S6 (Ser235/236)
27
28 (dilution 1:1000, Cat# 4858, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), GAPDH (dilution
29
30 1:100, Cat# AB2302, Sigma Aldrich, Sigma Aldrich), anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)
31
32 (dilution 1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-ERK1/2 (dilution 1:1000, Cat#
33
34 4695, Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-VEGF (dilution 1:1000, Cat# sc-7269,
35
36 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-TNF- α (dilution 1:1000,, Cat# ab1793,
37
38 Abcam, Cambridge, MA, USA), anti-phospho-NFk β (Ser536) (dilution 1:1000, Cat# 3036, Cell
39
40 signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-NFk β (dilution 1:1000, Cat# 8242, Cell Signaling,
41
42 Danvers, MA, USA), anti-ARG1 (dilution 1:1000, Cat# PA5-29645, ThermoFischer, Carlsbad, CA,
43
44 USA) and anti-NOS2 (dilution 1:1000, Cat# sc-651, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA,
45
46 USA). After incubation with the primary antibodies, membranes were washed and treated for
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 one hour with the following secondary antibody according to the source of the primary antibody:
4
5
6 peroxidase-affinipure goat anti-mouse IgG (dilution 1:10000, Cat# 115-035-146, Jackson
7
8 ImmunoResearch Labs, West Grove, PA, USA) and peroxidase-affinipure goat anti-rabbit IgG
9
10 (dilution 1:10000, Cat# 115-035-144, Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA, USA). After
11
12 this incubation, membranes were washed and developed using Amersham ECL Western Blotting
13
14 Reagent (Cat# RPN2124, GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburg, PA, USA). Staining was evaluated
15
16 using C-DiGit Blot Scanner (LiCor, Lincoln, NE, USA), and quantifications of the blots were
17
18 performed using the software Image J64 (<http://imagej.nih.gov/ij> NIH, USA).
19
20
21
22
23
24

25 Cell viability

26
27
28 Cells were seeded in 96-well plates and grown to 70% confluence. Then, the media were removed
29
30 and fresh media were added in the presence of different concentrations of CTZ (0–50 μ M). After
31
32 24 h, the media were removed and cells were harvested and resuspended in phosphate-buffered
33
34 saline (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) containing 0.1%
35
36 (vol/vol) bovine serum albumin (BSA, heat shock fraction, fatty acid free, protease free, Sigma
37
38 Aldrich, St. Louis, MO). Thereafter, 5 μ M 7-amino-actinomycin D (7-AAD, Thermo Fischer
39
40 Scientifics, Waltham, MA, USA) was added and suspended cells were evaluated by counting the
41
42 total number of cells and positive cells for 7-AAD staining (non-viable) by using a cell-sorting
43
44 system (Muse Cell Analyzer, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) (1).
45
46
47
48
49

50 To evaluate macrophage-conditioned medium (CM) effects on B16F10, cells were seeded in 96-
51
52 well plates in the appropriate medium and grown to 70% confluence. Then, the media were
53
54 removed, 24h Raw 264.7-CM treated (or not) with IL-4 was added, and B16F10 cells were
55
56
57
58
59
60

1
2
3 returned to the incubator in the presence of different concentrations of CTZ (0–50 μ M). After an
4
5 additional 24h, cell viability and cell proliferation were measured as described above.
6
7
8
9
10

11 Glucose uptake

12
13 Glucose uptake was determined by incubating cells with fresh medium containing 5 mM 6-(N-(7-
14 nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-6-deoxyglucose (6-NBDG, Molecular Probes, Invitrogen,
15 Life Technologies, Carisbad, CA, USA), a fluorescent glucose analogue. After 15 min, 30 min and
16 45 min incubation, the media were removed and the cells were washed with 6-NBDG-free
17 medium; 6-NBDG taken up by the cells was evaluated by fluorescence emission, according to the
18 manufacturer's instructions. Further, the glucose uptake rate was calculated by the linear
19 regression of the increase in fluorescence incorporated by the cells; these results are plotted as
20 the number of positive cells in a function of CTZ concentration, as previously described (5). In
21 addition, 20 μ M cytochalasin B, a glucose transporter blocker, was used as positive control for
22 glucose uptake inhibition.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 Mitochondrial reductive activity

41
42 Mitochondrial activity was assessed by the mitochondrial reductive potential, as previously
43 described (4), by incubating the cells in the presence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl
44 tetrazolium bromide (MTT, Sigma Chemicals Co. St. Louis, MO, USA) and evaluating the formation
45 of formazan products. Briefly, cells were seeded in 96-well plates (8×10^3 cells/well) and grown
46 to 70% confluency; then, cells were treated with different concentrations of CTZ for 24 hours.
47
48
49
50 After this period, the medium was removed and a solution of 5 mg/ml MTT was added, followed
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 by a three-hour incubation at 37°C. Then, the medium was removed and 100 µl DMSO was added
4
5
6 to dissolve the formazan crystals that had formed, which was evaluated by measuring the
7
8 absorbance at 560 nm subtracted by the absorbance at 670 nm (4).
9

10 11 12 Enzymatic activities

13
14 The enzymatic activities were evaluated, as previously described (6), after treatment for 24 h of
15
16 B16F10 cells seeded in 96-well plates and grown to 70% confluency. Following the treatment, the
17
18 media were removed and cells were lysed with 100 µl of 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) by
19
20 pipetting up and down several times. The cell-free homogenates were used for evaluating the
21
22 activities of the enzymes. Further, hexokinase activity was assessed in a reaction medium
23
24 containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 1 mM glucose, 1 mM ATP, 150 mM KCl, 0.2 mM
25
26 NADP⁺ and 0.2 mU/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase. Phosphofructokinase activity was
27
28 assessed in a reaction medium containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM MgCl₂, 1 mM (NH₄)₂SO₄,
29
30 1 mM fructose-6-phosphate, 0.1 mM ATP, 150 mM KCl, 0.2 mM NADH, 0.2 mU/ml aldolase, 0.4
31
32 mU/ml triosephosphate isomerase and 0.2 mU/ml α-glycerophosphate dehydrogenase.
33
34 Pyruvate kinase activity was assessed in a reaction medium containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4),
35
36 1 mM MgCl₂, 1 mM phosphor(enol)pyruvate, 1 mM ADP, 150 mM KCl, 0.2 mM NADH and 2
37
38 mU/ml lactate dehydrogenase. Reactions were initiated by adding 10 µl of the cell-free
39
40 homogenates and NAD(P) reduction/oxidation was followed spectrophotometrically at 340 nm.
41
42
43
44
45
46
47
48
49 The slopes of the curves were used to determine the enzymatic activities (6).
50
51
52
53
54

55 56 57 58 59 60 References

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1. Ausina, P. *et al.* (2020) Acetylsalicylic acid and salicylic acid present anticancer properties against melanoma by promoting nitric oxide-dependent endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Scientific Reports*, **10**,
2. Almeida-Oliveira, F. *et al.* (2017) Reference genes for quantitative PCR in the adipose tissue of mice with metabolic disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **88**, 948–955.
3. Bustin, S.A. *et al.* (2009) The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, **55**, 611–622.
4. Sola-Penna, M. *et al.* (2020) Serotonin activates glycolysis and mitochondria biogenesis in human breast cancer cells through activation of the Jak1/STAT3/ERK1/2 and adenylate cyclase/PKA, respectively. *British Journal of Cancer*, **122**, 194–208.
5. Furtado, C.M. *et al.* (2015) Phosphatidylinositol-3-kinase as a putative target for anticancer action of clotrimazole. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **62**, 132–141.
6. Furtado, C.M. *et al.* (2012) Clotrimazole preferentially inhibits human breast cancer cell proliferation, viability and glycolysis. *PLoS ONE*, **7**,