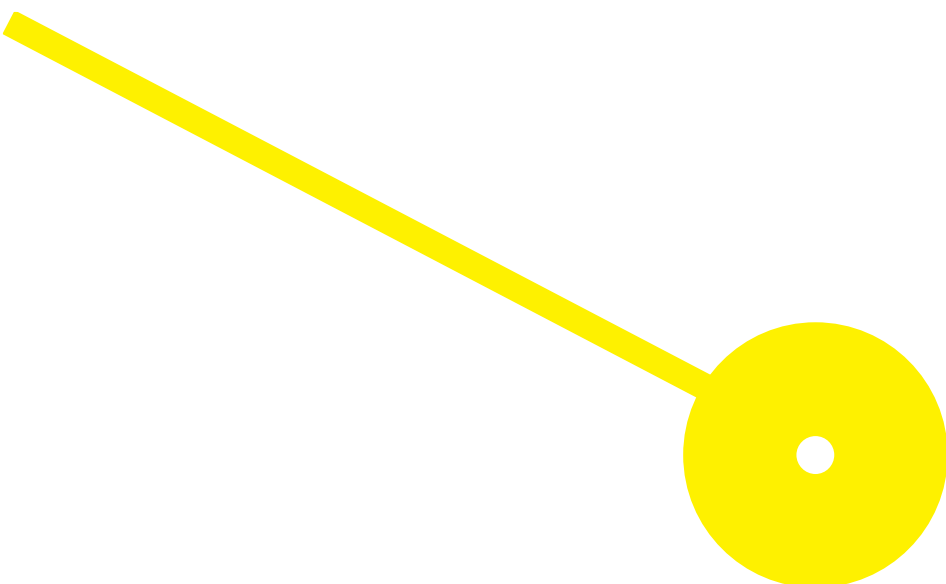




O papel do GPR81 no cancro de pulmão de não pequenas células

Ana Margarida Ribeiro da Silva

10/2022





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



O papel do GPR81 no cancro de pulmão de não pequenas células

Autor

Ana Margarida Ribeiro da Silva

Orientadores

Prof. Doutora Sara Granja, Professora Adjunta da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto (ESS|P.PORTO) e Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde (ICVS)

Prof. Doutora Mónica Vieira, Professora Coordenadora e Presidente do Conselho Pedagógico da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto (ESS|P.PORTO)

Esta dissertação é apresentada para o cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica em Saúde – Ramo em Bioquímica Aplicada pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

O trabalho apresentado nesta tese foi realizado no Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde (ICVS), Faculdade de Medicina da Universidade do Minho, Braga, Portugal (Laboratório Associado do Governo ICVS/3B'S-PT Braga/Guimarães, Portugal). O apoio financeiro foi assegurado pelo projeto NORTE-01-0145-FEDER-000055, apoiado pelo Programa Operacional Regional Norte Portugal (NORTE 2020), no âmbito do Acordo de Parceria PORTUGAL 2020, através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), ICVS Plataforma de Microscopia Científica, membro da Infraestrutura Nacional PPBI – Plataforma Portuguesa de Bioimagem (PPBI-POCI-01-0145-FEDER-022122), e por fundos Nacionais, através da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) – projeto UIDB/50026/2020 e UIDP/50026/2020.



Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora Sara Granja por me ter dado a oportunidade de fazer parte do seu grupo de trabalho e me ter ensinado tudo o que aprendi neste ano. Agradeço por sempre me incentivar a fazer o meu melhor mesmo quando as coisas não corriam tão bem.

À minha coorientadora Mónica Viera agradeço por sempre me ter ajudado quando precisei no decurso de todo este mestrado e por sempre estar disponível para me incentivar.

A todos os integrantes do domínio das Ciências Cirúrgicas do ICVS agradeço por todo o carinho e conhecimento que partilharam comigo. Deixo um especial agradecimento à Sara Barbosa, que sempre me ajudou nos bons e nos maus momentos e que sem ela esta tese não seria nem metade!

À minha Sara Costa, que sempre me apoiou desde a licenciatura até ao mestrado, sem ti nada disto teria sido possível! Obrigado por me ouvires, rires comigo das coisas mais parvas e sempre estares lá quando precisava de um ombro amigo para não desistir de tudo!

Um enorme agradecimento aos meus amigos de coração Diana, Ricky, Melo, Carol, João, Rui, Bia e Tânia, por sempre me puxarem para cima mesmo quando estava em baixo, pelo vosso apoio, compreensão e por me incentivarem a ser sempre melhor. À minha Di agradeço ainda por todas as discussões de Bioqs 😊!!

À minha família agradeço todo o apoio, incentivo e conselhos que me deram. Agradeço especialmente à minha mamã que sempre me apoiou nas minhas decisões e esteve sempre lá a puxar-me para cima, para me ver no lugar mais alto que eu podia alcançar, sem nunca duvidar que eu conseguia, mesmo quando eu não conseguia ver a luz ao fundo do túnel. Obrigado por tudo o que fizeste e fazes por mim, amo-te até ao infinito.

À minha estrelinha, sei que estas sempre ao meu lado a puxar por mim.

Resumo

O cancro do pulmão é uma das doenças oncológicas mais frequentes e mais mortíferas em todo o mundo, uma vez que quase todos os casos quando descobertos já estão num estadio avançado. Por estas razões estudar o cancro do pulmão e fatores que possam diminuir o seu desenvolvimento ou crescimento tem sido alvo de vários estudos.

O GPR81, é um recetor acoplado à proteína G, que tem sido retratado como consideravelmente aumentado em vários tumores sólidos, e que quando ativo estimula o crescimento tumoral, evasão imunológica, migração e metastização.

Assim o nosso objetivo foi testar em duas linhas celulares de cancro de pulmão –A549 e PC9 – se a inibição do recetor com o ácido 3-hidroxi-butirato (3-OBA) ou a estimulação com ácido 3,5-dihidroxi-benzoico (3,5-DHBA) conferia às células um maior ou menor desenvolvimento tumoral.

Para isso realizamos vários tipos de ensaios como viabilidade celular, formação de esferóides e colónias assim como ensaio de migração por *wound healing*, e concluímos que o GPR81 diminui a proliferação celular *in vitro* quando é inibido farmacologicamente pelo 3-OBA. A administração de 3,5-DHBA não provoca qualquer alteração na proliferação das células tumorais.

Estes resultados evidenciam que a inibição do GPR81 pode ser usada para a elaboração de um novo tratamento para o cancro do pulmão.

Palavras-chave: GPR81; 3,5-DHBA; 3-OBA; cancro pulmão

Abstract

Lung cancer is one of the most frequent and deadliest oncological diseases in the world, since almost all cases when discovered are already at an advanced stage. For these reasons, studying lung cancer and factors that may decrease its development or growth has been the subject of several studies.

GPR81, a G protein-coupled receptor, has been shown to be considerably increased in several solid tumors, and when active, stimulates tumor growth, immune evasion, migration and metastasis.

Therefore, our objective was to test in two lung cancer cell lines –A549 and PC9 – whether the inhibition of the receptor with 3-hydroxybutyrate acid (3-OBA) or stimulation with 3,5-dihydroxybenzoic acid (3,5- DHBA) conferred to the cells a greater or lesser tumor development.

For this, we performed several types of assays such as cell viability, spheroid and colony formation as well as a wound healing migration assay, and we concluded that GPR81 decreases cell proliferation in vitro when it is pharmacologically inhibited by 3-OBA. Administration of 3,5-DHBA does not cause any change in tumor cell proliferation.

These results show that GPR81 inhibition can be used to design a new treatment for lung cancer.

Keywords: Lung cancer; NSCLC; GPR-81; 3,5-DHBA; 3-OBA

Índice

1. Introdução	1
1.1. Cancro do pulmão	1
1.2. Cancro de pulmão de não pequenas células (CPNPC)	2
1.3. Recetores Acoplados à proteína G (GPCRs)	4
1.4. Recetor 81 acoplado à proteína G (GPR81)	5
2. Objetivos	7
3. Materiais e Métodos	7
3.1. Linhas celulares e cultura celular	7
3.2. Drogas	Erro! Marcador não definido.
3.3. Western Blotting (WB)	8
3.4. Ensaio da viabilidade celular com Sulforodamina B (SRB)	10
3.5. Ensaio de formação de colónias	11
3.6. Ensaio de migração celular por <i>Wound healing</i>	11
3.7. Ensaio de formação de esferóides	12
3.8. Análise Estatística	12
4. Resultados	13
5. Discussão	23
6. Conclusão	26
Referências Bibliográficas	27

Lista de abreviações

3-OBA	Ácido 3-hidroxi-butírico
3,5-DHBA	Ácido 3,5-di-hidroxi-benzóico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALK	Quinase de linfoma anaplásico
BRAF	Proto-oncogene B-Raf
cAMP	Adenosina 3,5-monofosfato cíclico
CD	Células dendríticas
CEA	Antígeno carcinoembrionário
CO₂	Dióxido de carbono
CP	Cancro do Pulmão
CPPC	Cancro de Pulmão de Pequenas Células
CPNPC	Cancro de Pulmão de não pequenas células
CYFRA 21-1	Fragmento da citoqueratina 19 da proteína do tecido epitelial
DAG	Diacilglicerol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECL	Quimiluminescência aprimorada
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Recetor do fator de crescimento epidérmico
FBS	Soro Fetal Bovino
GDP	Guanosina difosfato
GPCRs	Recetores acoplados à proteína G
GPR81	Recetor 81 acoplado à proteína G
GTP	Guanosina trifosfato
HCAR1	Recetor de ácido hidrocarboxílico 1
HRP	Horseradish peroxidase
IL-10	Interleucina 10
KEAP1	Proteína 1 associada à ECH do tipo Kelch
KRAS	Kirsten rat sarcoma
MCTs	Transportadores de monocarboxilatos

MT	Microambiente tumoral
N₂	Azoto
Na₃PO₄	Fosfato trissódico
Na₄P₂O₇	Pirofosfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
NK	Células <i>natural killer</i>
NSE	Enolase neuroespecífica
O₂	Oxigénio
Pen-Strep	Penicilina-streptomicina
PET	Tomografias por emissão de positrões
ROS1	Recetor de tirosina-quinase 1
SCCA	Antígeno de carcinoma de célula escamosas
SDS-PAGE	Gel de Dodecilsulfato de sódio com poliacrilamida
STK11	Proteína tipo quinase
TP53	Proteína tumoral p53
WB	Western Blotting

Índices de figuras

Figura 1 - Ativação da proteína GPCR.....	4
Figura 2 - Ativação GPR81	6
Figura 3 - Ensaio de viabilidade celular da linha A549 e da linha PC-9.	14
Figura 4 - Análise de Western Blotting da linha A549 e da linha PC-9	15
Figura 5 - Percentagem de migração nas células A549 e PC-9 tratadas com 100 µM 3,5-DHBA	16
Figura 6 - Percentagem de migração nas células A549 e PC-9 tratadas com 20 mM 3-OBA a pH de 6,8	17
Figura 7 - Percentagem de migração nas células A549 e PC-9 tratadas com 20 mM 3-OBA a pH de 7,4.....	18
Figura 8 - Número de colónias formado na linha celular A549 e PC-9	20
Figura 9 - Análise da formação de esferoides da linha A549 e da linha PC-9 tratadas com 100 µM 3,5-DHBA.....	21
Figura 10 - Análise da formação de esferoides da linha A549 e da linha PC-9 quando tratadas com 20 mM 3-OBA.....	22

Índice de tabela

Tabela 1 - Anticorpos Primários	10
Tabela 2 - Anticorpos Secundários.....	10

1. Introdução

1.1. Cancro do pulmão

O Cancro do Pulmão (CP), é um tumor maligno broncogénico do epitélioma das vias aéreas, e é o segundo tipo de cancro com maior incidência no mundo e também é considerado o cancro mais mortífero segundo a *Globocan2020* (1–4). Só no ano de 2020 foram diagnosticados cerca de 2,2 milhões de novos casos, o que equivale a 11,4% do total de casos oncológicos detetados em todo o mundo, e morreram em torno de 1,8 milhões de pessoas com CP, aproximadamente 18% do total de óbitos por cancro, o que evidencia a agressividade desta neoplasia (1,5).

Este tipo de tumor é especialmente recorrente em países e áreas desenvolvidas como os Estados Unidos ou países da Europa mas tem vindo a decair nos últimos anos devido à implantação de políticas de controlo do uso de tabaco e do avanço da educação pública sobre o uso do tabaco. Por outro lado nos países com baixo ou médio poder de compra como países asiáticos e africanos têm vindo a aumentar pela crescente facilidade de acesso (1,5,6).

Globalmente a biologia do cancro de pulmão também varia de etnia para etnia, sendo que em pacientes asiáticos o cancro do pulmão apresenta muitas das vezes mutações no recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) enquanto que em pacientes caucasianos a mutação predominante é no *Kirsten rat sarcoma* (KRAS) (7). Também há o surgimento de outras mutações mais abrangentes como na quinase de linfoma anaplásico (ALK), nos genes supressores tumorais como proteína tumoral p53 (TP53), proteína 1 associada à ECH do tipo Kelch (KEAP1), na proteína tipo quinase (STK11) e NF1, assim como nos proto-oncogenes B-Raf (BRAF) e do recetor de tirosina-quinase 1 (ROS1) (8,9).

Em Portugal, o CP é a quarta neoplasia maligna mais comum com cerca de 5500 casos por ano segundo a *Globocan2020*, mas é a principal causa de morte por cancro no sexo masculino. A incidência deste tumor é menor nas mulheres com cerca de 6% de novos casos ao ano, porém ao longo das últimas décadas o número de pacientes do sexo feminino têm vindo a aumentar de ano para ano no país devido ao aumento do uso de tabaco por parte das mulheres (2,10,11).

Cerca de 90% dos CP diagnosticados em homens e 80% em mulheres devem-se ao tabagismo ativo, onde os compoentes do fumo do tabaco causam modificações da informação genética das células do pulmão. O fumo do tabaco contém mais de 4000 produtos químicos, incluindo sensivelmente 70 carcinogénicos. Aproximadamente 5–10% dos CP são causados por exposição ocupacional, incluindo exposição a arsénio, cádmio, cromo, diesel, produção de alumínio, fundição de ferro e aço, sendo que a exposição a amianto é a mais comum (6,8,12).

Para além deste fatores, outros como tabagismo passivo, exposições a rádon, poluição do ar, doenças pulmonares crónicas como asma e a suscetibilidade genética podem estar na causa da

formação desta neoplasia. Este último fator é o mais recorrente quando o CP surge em pacientes com uma idade inferior a 50 anos. (1,2,6,8,10,12–14).

Outra razão para o surgimento do CP nos últimos anos é o uso de cigarros eletrônicos. Estes dispositivos contêm uma mistura de nicotina líquida, aromatizantes e outros solventes químicos como compostos carbonílicos tóxicos e cancerígenos que podem causar inflamação, citotoxicidade, aumento da permeabilidade nas células endoteliais do pulmão e falhas agudas na função pulmonar (6,8,12).

A idade média de diagnóstico deste tipo de cancro é de 70 anos tanto para homens como mulheres e em cerca de 75% dos pacientes o CP é diagnosticado em estadios avançados, muitas das vezes já com a doença localmente avançada ou com a existência de metástases, em consequência do início tardio dos sintomas e devido à ineficácia das ferramentas de diagnóstico, que não são suficientemente sensíveis (6). Por esta razão, os pacientes apresentam um mau prognóstico e baixas taxas de sobrevivência quando da descoberta da doença (1,10,15).

Este tipo de tumor pode ser diagnosticado por várias abordagens de diagnóstico como raio-X, citologia do escarro, tomografias computadorizadas, tomografias por emissão de positrões (PET), exames histológicos de biópsias tumorais e marcadores tumorais (1,15).

1.2. Cancro de pulmão de não pequenas células (CPNPC)

O CP é histologicamente dividido em dois tipos: o cancro de pulmão de pequenas células (CPPC) e o cancro de pulmão de não pequenas células (CPNPC) (12,13,16–18). Aproximadamente 85% dos CP são de cancro de pulmão de não pequenas células enquanto os restantes 15% são de cancro de pulmão de células pequenas (1,16–19).

O CPNPC é subdividido em três subtipos: aproximadamente 40% são adenocarcinomas pulmonares, 25–30% são carcinomas celulares escamosos e 10–15% são carcinomas de grandes células. Os adenocarcinomas são a forma mais comum deste tipo de CP, tanto em homens como em mulheres e a sua incidência é cada vez maior, e este subtipo normalmente está localizado na periferia do pulmão e têm um crescimento lento; já a ocorrência dos carcinomas celulares escamosos tem vindo a diminuir desde da década de 80 e são o subtipo que tende a causar sintomas mais precocemente e localizam-se preferencialmente na região central do pulmão; por fim, os carcinomas de grandes células são o subtipo menos comum e podem localizar-se em qualquer zona do pulmão, têm a tendência de crescer rapidamente e causar sintomas tardios (1,12,13). Esta mudança de tendência de subtipo histológico deve-se à troca de cigarros não filtrados para o uso de cigarros filtrados e o aumento da concentração de nitrosaminas e diminuição da nicotina nos cigarros, pois antes de os cigarros serem filtrados não havia uma inalação profunda e consequentemente o fumo do tabaco afetava principalmente a traqueia e os brônquios originando neoplasias mais centrais. Hoje em dia, como os

cigarros são filtrados a fumaça do tabaco dispersa-se mais na árvore respiratória causando adenocarcinomas de distribuição mais periférica (12,16–18).

O CPCNP surge maioritariamente em pacientes com idades superiores a 70 anos, especialmente na população septuagenária com histórico de tabagismo (10).

A heterogeneidade tumoral tem um impacto importante não apenas na classificação do tumor, mas também no diagnóstico, definição do prognóstico e na decisão terapêutica (20).

As ferramentas de diagnóstico como radiografias do tórax e citologia do escarro não são suficientemente sensíveis para o diagnóstico de CPCNP. Os biomarcadores tumorais como antígeno carcinoembrionário (CEA), fragmento da citoqueratina 19 da proteína do tecido epitelial (CYFRA 21-1), enolase neuroespecífica (NSE) ou antígeno de carcinoma de célula escamosas (SCCA) são usados para um diagnóstico mais precoce e preciso para este subtipo. O CYFRA 21-1 é o marcador de eleição para o CPCNP e permite separar doenças malignas das benignas com uma especificidade de cerca de 95%. Porém nenhum destes marcadores tornam o diagnóstico possível num estágio inicial do CP (15).

O CP é um cancro muito difícil de tratar, não só porque os pacientes são diagnosticados tardiamente, mas também devido à heterogeneidade dos tumores pulmonares devido à exposição a longo prazo aos carcinogénicos e da instabilidade cromossómica, e pelo facto de que tem de se adaptar o tratamento de acordo com o subtipo histológico (15,18–20). Para o tratamento recorre-se a vários métodos, nomeadamente cirurgia, quimioterapia, radioterapia, terapias dirigidas e imunoterapia e a sua administração está dependente de inúmeros fatores como o tamanho da massa tumoral, a localização, a extensão e a caracterização histológica e molecular do tumor (13,18,21).

Os pacientes com adenocarcinomas pulmonares são os que possuem maior seleção de opções de tratamento, uma vez que estes recebem combinações de quimioterapia, terapia dirigida como por exemplo inibidores de EGFR e ALK, e imunoterapias de acordo com a estratificação genotípica e fenotípica do cancro o que resulta num aumento substancial da sobrevida destes pacientes. Para os pacientes com carcinomas celulares escamosos as opções de tratamento são mais limitadas, mas recentemente tem-se usado imunoterapia para o tratamento. Já os CPPC não têm quase nenhuma opção de tratamento o que contribui para a diminuição da sobrevida destes pacientes (18).

Para além de ser um tumor maligno com opções de tratamento limitadas o risco de desenvolver um CP secundário é bastante elevado especialmente em pacientes com CPCNP removido em estágio I e II (18).

Como esta neoplasia é tão difícil de tratar e diagnosticar é importante encontrar novas metodologias de diagnóstico que consigam detetar o CP em estágios iniciais, assim como a criação de programas de rastreio mais frequentes e novos tratamentos mais eficazes.

1.3. Recetores Acoplados à proteína G (GPCRs)

Os recetores acoplados à proteína G (GPCRs) são uma das maiores e mais diversificadas famílias de proteínas que estão na membrana das células eucarióticas e que medeiam a maioria das respostas celulares que controlam vários processos biológicos fundamentais como crescimento, metabolismo, percepção de imagens, odores e sabores assim como podem contribuir para a homeostase corporal (21,22). Eles são importantes para a detecção de moléculas de sinalização como hormonas e neurotransmissores, assim como iões, fotões e pequenas moléculas orgânicas (23). Estes recetores servem também como interface de comunicação entre o ambiente extracelular e intracelular e por isso são essenciais para muitos eucariotas como plantas, fungos e protozoários (23).

Os GPCRs são compostos por um único polipéptido dobrado numa forma globular e estão incorporados na membrana plasmática de uma célula em sete fragmentos. Eles interagem com proteínas G na membrana e quando uma molécula sinalizadora se liga ao recetor, estes sofrem alterações conformacionais que desencadeiam a interação entre o GPCR e uma proteína G próxima e ativam as vias de sinalização citosólica, surgindo então uma resposta celular (24,25).

As proteínas G são proteínas que tem a capacidade de ligar os nucleótidos de guanosina trifosfato (GTP) e guanosina difosfato (GDP), e que possuem três subunidades diferentes: uma subunidade alfa, uma beta e uma gama. A subunidade alfa da proteína G liga-se ao GTP se a proteína estiver ativa, mas caso não haja nenhum sinal a subunidade liga-se ao GDP e todo o complexo formado liga-se a um GPCR próximo. Esta ligação mantém-se até uma molécula sinalizadora se ligue ao GPCR, que por sua vez ativa a proteína G e o GDP é substituído por GTP. Isto resulta na formação de dois complexos, um constituído pela proteína G ligada à subunidade alfa e outro composto pelas outras duas subunidades, até que o GTP seja hidrolisado e o GDP se volte a ligar ao GPCR tornando-o inativo e interrompendo a sinalização (24–26).

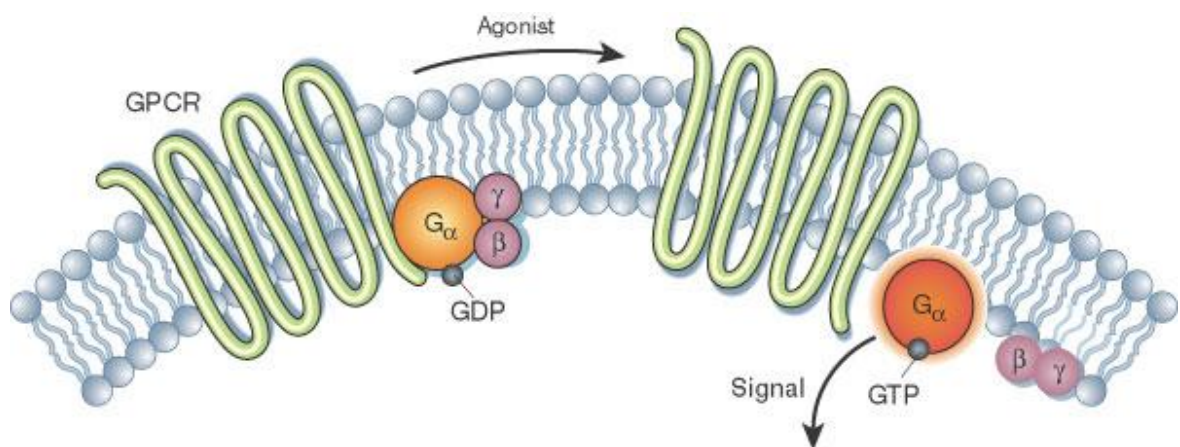


Figura 1 – Ativação da proteína GPCR. Num estado inativo a subunidade α interage com o GDP e todo o complexo liga-se a um GPCR. Quando estimulado por um agonista que se liga ao GPCR, o GDP é substituído por GTP, que origina a separação do complexo em dois, um formado pela subunidade α ligada à proteína G e outro formado pelas subunidades $\beta\gamma$. Imagem disponível DOI: 10.1038/nature01307 (24).

Quando uma proteína G está ativa ela emite sinais que atuam em alvos específicos como enzimas ou canais iônicos que produzem milhares de segundos mensageiros como adenosina 3,5-monofosfato cíclico (cAMP) ou diacilglicerol (DAG) que podem estimular ou inibir esses alvos (24,25).

Os seres humanos têm cerca de 1000 GPCRs diferentes, e cada subtipo do recetor tem um ligando específico que ativa uma atividade de transdução de sinal específica (21,23,25).

Desregulações nos GPCRs tem como consequência inúmeras doenças como diabetes tipo II, Alzheimer, hipertensão e insuficiência cardíaca. Estudos recentes mostraram que GPCRs ativos são essenciais na iniciação e progressão tumoral, invasão, metástases, migração, adesão e angiogênese uma vez que estes estabelecem e mantem um microambiente tumoral (MT) permissivo para a formação de tumores (22). Por essa razão, muitas das células cancerígenas expressam GPCRs de maneira aberrante incluindo cancro do pulmão, próstata, colon e pâncreas, o que sugere que estes recetores podem servir como potenciais alvos para o desenvolvimento de terapias oncológicas (22).

1.4. Recetor 81 acoplado à proteína G (GPR81)

O recetor 81 acoplado à proteína G (GPR81) também designado por recetor de ácido hidrocarboxílico 1 (HCAR1) é um membro da família de GPCRs que é encontrado em todos os mamíferos e peixes. Em seres humanos ele é maioritariamente expresso em adipócitos, onde a sua ativação induz a inibição da lipólise através da redução do monofosfato de adenina cíclico (cAMP) e da atividade da proteína quinase A, mas também é expresso no intestino, no rim, no pulmão e em níveis mais baixos no cérebro onde modula as taxas de impulso nervoso que promove a angiogênese cerebral (27–33). *Roland et al.* (34), demonstraram pela primeira vez em 2014, que o GPR81 era importante e indispensável para a regulação das células tumorais pancreáticas nos mecanismos de transporte de lactato e na alteração da expressão dos transportadores de monocarboxilatos (MCTs) 1 e 4 na presença de lactato e glicose, pois desempenhava um papel vital nas vias de sinalização intracelular que facilitam o crescimento e o metabolismo do cancro assim como na evasão imunológica e metástases (35). Desde daí vários investigadores como *Stäubert et al.* (36), evidenciaram que a expressão de GPR81 é elevada em vários tumores sólidos, incluindo cancro da mama, cervical, pancreático e hepatocelular promovendo a angiogênese, sobrevivência e proliferação celular (37–39). Já nas células tumorais benignas a expressão de GPR81 é insignificante (37).

Uma das características malignas nas células tumorais é a reprogramação do metabolismo energético caracterizado pelo efeito de *Warburg*. Este fenótipo é caracterizado por uma sobreexpressão de transportadores e enzimas envolvidos na via glicolítica, levando a um aumento do consumo de glucose para que haja a manutenção do crescimento e proliferação celular. Ao contrário das células normais que desviam o piruvato para a mitocôndria para a realização da fosforilação oxidativa, as células tumorais convertem-no em lactato mesmo em condições ótimas de oxigénio. Este

transporte é realizado através dos MCTs que realizam o influxo e efluxo de ácido láctico. O lactato é acumulado no MT em concentrações entre 5–20mM, levando a uma acidificação deste (27,37–41). Vários estudos mostram que a acidificação do MT desempenha um papel fundamental na agressividade tumoral, devido à supressão da resposta imune dentro do MT inibindo a atividade de células T e células *natural killer* (NK), promovendo a diferenciação de células dendríticas (CD) produtoras de interleucina 10 (IL-10). Estas alterações levam ao aumento proliferação, da migração e invasão das células tumorais, aumento da angiogénese e evasão do sistema imunitário bem com a resistência à terapia anti-tumoral (27,38,41–43).

Estudos recentes mostram que o lactato é o ligando endógeno do GPR81, sendo portanto este considerado um sensor de lactato em órgãos periféricos (27–29,38,40,44). Este metabolito do metabolismo energético age como fonte de energia e ativa este recetor ligando-se diretamente ao GPR81 a jusante, resultando na propagação de sinais intracelulares através da proteína G. Esta ativação resulta em uma *downregulation* do cAMP que origina uma diminuição da concentração de cAMP intracelular (45). Como o lactato se liga ao GPR81, este recetor controla o transporte de lactato e subsequente produção de ATP, assim como ativa a STAT3 e promove a expressão de GPR81 (46).

O lactato pode atuar no GPR81 por via autócrina ou parácrina. Na via autócrina, o lactato produzido pelas células tumorais ativa o próprio recetor; enquanto na via parácrina o lactato gerado pelas células cancerígenas ativa o recetor de células do estroma (31,38,47). Ambos os mecanismos podem influenciar o crescimento e a proliferação de células tumorais, uma vez que há um *crossstalk* funcional entre as células tumorais e as células do estroma (43). A acumulação de lactato no ambiente extracelular está associada a um mau prognóstico. Ensaio realizado por Brown et al. (48), demonstraram que o lactato proveniente das células tumorais ativava o GPR81 em células dendríticas, promovendo a evasão de células imunes ao inibir a apresentação de antígenos específicos do tumor (45). O lactato produzido em MT hipóxicos pode ainda interagir com o GPR81 e induzir a expressão da proteína de morte celular programada 1 (PD-L1) o que resulta na supressão de células T e de um MT imunossupressor (49).

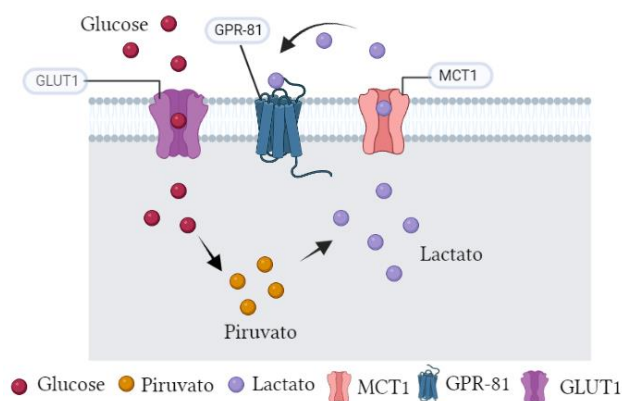


Figura 2 - Ativação GPR81. A glucose entra na célula pelo GLUT1 e através da glicólise é convertida em piruvato. Este piruvato é convertido em lactato que é exportado para fora das células através do MCT1. Quando está no meio extracelular, o lactato liga-se ao GPR81 ativando-o. Elaborado no BioRender ®.

Para além do lactato o GPR81 têm um agonista específico, o ácido 3,5-dihidroxibenzoico (3,5-DHBA) que imita os efeitos do lactato em células tumorais e um antagonista o ácido 3-hidroxibutirato (3-OBA) que alguns estudos demonstram que consegue imitar o efeito do knockout do GPR81 assim como anular os efeitos induzidos pelo lactato e 3,5-DHBA (50–53).

Quando o recetor está ativo ele aumenta a expressão de GPR81 e estimula as vias de sinalização intracelular aumentando a expressão de MCT1 e MCT4 bem como expressão a proteína chaperona dos MCTs, o cluster de diferenciação 147 (CD147), que facilitam o crescimento tumoral, angiogénese, evasão imunológica, migração e metastização. (40,43,54). Análise de dados de TCGA, realizados por Brown et al. mostraram que a alta expressão de GPR81 é associada a um mau prognóstico em pacientes com cancro da mama (48).

Estudos comprovam que quando há uma interferência na expressão de GPR81 há uma redução significativa na atividade mitocondrial ao diminuir a sensibilidade das células tumorais ao lactato assim como há uma diminuição da expressão de MCT1, que resulta numa diminuição drástica na proliferação tumoral e metástases in vitro e in vivo e aumento da apoptose (55). Estes resultados evidenciam que os níveis de expressão de GPR81 estão correlacionados com a taxa de crescimento tumoral e que o lactato suporta a sobrevivência, o crescimento e o comportamento metastático através da sinalização do GPR81.

No cancro do pulmão, o GPR81 quando ativo diminui os níveis de cAMP intracelular e aumenta os níveis da PD-L1, desencadeando vias de sinalização intracelular que levam ao crescimento tumoral, evasão imune e metástases, evidenciando que a ativação do GPR81 promove um perfil pró-tumoral (49,56,57).

2. Objetivos

Este projeto tem como objetivo avaliar o papel do GPR81 em linhas celulares de cancro de pulmão, A549 e PC-9, especialmente descobrir qual é o efeito da inibição e estimulação do GPR81 na modulação das características tumorais das linhas celulares, através de ensaios de viabilidade celular, de migração e de proliferação das células tumorais.

3. Materiais e Métodos

3.1. Linhas celulares e cultura celular

As linhas celulares de adenocarcinoma de pulmão humano A549 e PC9 foram usadas neste estudo. As A549 foram estabelecidas em 1972 por *D.J. Giard et al* por meio de uma cultura do tecido

pulmonar de um adenocarcinoma de um homem caucasiano de 58 anos (58–60). Esta linha celular é categorizada como carcinoma de pulmão de não pequenas células, As PC-9 foram inicialmente depositadas pelo *Riken BioResource Center* em 1989 pelo nome de PC-14 como uma linhagem celular derivada de um adenocarcinoma pulmonar humano do tipo indiferenciado. Depois de uma análise de perfil mais elaborada em colaboração com o *Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd* concluíram que a linha celular anteriormente estabelecida era idêntica à PC-9, uma linha celular derivada de adenocarcinoma de pulmão humano, mas do tipo diferenciado, e então a identificação da linha foi alterada de PC-14 para PC-9 (61,62).

Ambas as linhas foram mantidas em *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) contendo 4,5 g/L de D-glicose (D6429, Sigma) suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS)(F7524, Sigma) e 1% do antibiotico de amplo espectro penicilina-streptomicina (Pen-Strep,) numa razão de 100 unidades/mL de penicilina com 100 ug/mL de streptomicina numa incubadora com uma atmosfera humificada com 5% dióxido de carbono (CO₂) a 37°C para que ocorra o crescimento das células (63,64). O DMEM serve como fonte de vitaminas, aminoácidos e glucose essenciais para as células mas também serve para manter os níveis de pH e de osmolaridade do meio, enquanto que o FBS contém enzimas, hormonas, vitaminas e fatores de crescimento fundamentais para a proliferação e manutenção celular (65–67). Já o Pen-Strep é usado para prevenir contaminações bacterianas ao manter as condições estéreis (68,69). Ambas as células crescem em monocamada aderente (70).

3.2. Fármacos

De modo a avaliar o papel do GPR81 na agressividade das células tumorais a sua expressão será estimulada com a adição do ácido 3,5-di- hidroxibenzóico (3,5-DHBA) da Sigma-Aldrich (D110000) ou iniba usando o ácido 3-hidroxi-butírico (3-OBA) também da Sigma-Aldrich (166989-5G) (71). O fármaco 3,5-DHBA foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) (D6878-100mL, Honeywell) enquanto o 3-OBA foi em soro fisiológico 0,9%.

3.3. Western Blotting (WB)

O Western Blotting (WB) foi usado para validar a estimulação e/ou inibição do recetor através da avaliação da expressão da proteína GPR81. O WB é um teste que permite a transferência de proteínas separadas por eletroforese num gel de dodecilsulfato de sódio com poli-acrilamida (SDS-PAGE) para uma membrana adsorvente. Este ensaio consegue detetar e caracterizar uma infinidade de proteínas, mesmo as que se encontram em baixa abundância (72).

Para a avaliação de expressão do GPR81 nas linhas celulares em estudo, 5×10^5 de células A549 e 6×10^5 de células PC-9 foram plaqueadas em placas de 6 poços e após incubação durante a

noite, foram administrados os fármacos – 3,5-DHBA e 3-OBA e os respectivos veículos como condição controle, incubado durante 24 horas.

Para a extração de proteína, as células foram previamente lavadas com solução tampão fosfato-salino (PBS) 1X frio e posteriormente adicionou-se o tampão de lise – 50 mM Tris pH 7.6–8,0; 150 mM NaCl; 5 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); 1 mM fosfato trissódico (Na_3PO_4); 10 mM fluoreto de sódio (NaF); 10 mM pirofosfato de sódio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$); 1% NP-40 – suplementado com inibidores de proteases (11697498001, Roche®). Com a ajuda de um raspador procedeu-se à lise celular, a amostra foi recolhida para um eppendorf e mantida em gelo durante 15 minutos. Procedeu-se a uma centrifugação a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C, e no final recolheu-se apenas o sobrenadante (72).

De seguida para determinar a concentração total de proteínas nas diferentes amostras utilizou-se o método colorimétrico de Bradford. Assim, numa placa de 96 poços, colocou-se 2 µL de amostra, 100 µL de PBS1X e 200 µL do corante Coomassie Blue. As proteínas ligam-se ao corante Coomassie Blue o que faz com que a cor acastanhada mude para diferentes tonalidades de azul conforme a concentração da proteína. De modo a quantificar exatamente a concentração de proteína na nossa amostra foi realizada uma curva padrão com diferentes concentrações conhecidas de BSA. Após incubação durante 15 minutos, procedeu-se à leitura da absorvância a 595 nm.

Para a realização do WB, a 30 ng de proteína é adicionado 1/3 de *Laemmli 4X Sample buffer* (1610747, BioRad) diluído com β-mercaptoetanol. Este tampão contém azul de bromofenol que auxilia na determinação da frente da corrida evitando a perda da amostra, glicerol para depositar toda a amostra no poço e SDS para desnaturar as proteínas e conferir a todas carga negativa, para que elas se separem efetivamente por tamanho e não por carga. Após isto as amostras são desnaturadas por 5 minutos a 98°C no *Thermoblock*.

Proteínas são então carregadas num gel de 10% SDS-PAGE, que permite a separação de proteínas por massa. Depois da corrida transferiu-se as proteínas separadas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences) através de um sistema de transferência Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) com voltagem de 1,5V e amperagem de 300 mA durante 30 minutos. Depois da transferência as membranas foram bloqueadas em leite diluído em TBS 1X por 60 minutos e incubadas com os anticorpos primários durante a noite a 4°C (Tabela 1). No dia seguinte procedeu-se à lavagem das membranas com TBS-T e incubou-se as membranas com os anticorpos secundários durante 1 hora à temperatura ambiente (Tabela 2). Os anticorpos secundários são acoplados à *Horseradish peroxidase* (HRP) que quando é oxidada produz luz ao atuar em substratos quimioluminescentes.

Os níveis de proteína foram detetados por quimiluminescência utilizando os kits de quimiluminescência aprimorada (ECL) para WB (170-5060, Bio-Rad; K-12043-D10, Advansta) e

usando o *Azure Sapphire™ Biomolecular Imager* para obter a luminescência provocada pela incubação do ECL com a membrana (72).

Tabela 1- Anticorpos Primários

Proteína	Referência	Diluição
GPR81	Rabbit SAB-1300089 (Sigma-Aldrich)	1/200
β-Tubulina	Mouse BL605102 (BioLegend®)	1/1000

Tabela 2 - Anticorpos Secundários

Proteína	Referência	Diluição
Goat Anti-Rabbit IgG BP-HRP	ab7074 (abcam)	1/5000
Anti-Mouse IgG-HRP	sc-516102 (Santa Cruz Biotechnology®)	1/5000

3.4. Ensaio da viabilidade celular com Sulforodamina B (SRB)

O ensaio da sulfarrodamina B (SRB) foi utilizado para calcular a viabilidade e citotoxicidade induzida pelas drogas uma vez que este ensaio não é destrutivo, é rápido, os resultados são bastante estáveis e é barato (73,74). Foram plaqueadas em triplicado 1×10^4 células A549 e PC-9 por poço em placas de 96 poços e deixadas aderir durante a noite. No dia seguinte foram administrados, a cada linha celular, os fármacos 3,5-DHBA (2, 5, 10, 50 e 100 μ M) e o 3-OBA (10, 20, 50 e 100 mM). Células tratadas com os respectivos veículos de cada droga foram usadas como o grupo controle.

Após 24, 48 e 72h as células aderidas na placa foram fixadas com ácido tricloroacético (TCA) a 10% frio durante 1 hora a 4°C. De seguida as células foram coradas com SRB a 0,4% dissolvido em ácido acético a 1% por 30 minutos. O SRB é um corante aniônico de proteínas rosa escuro com dois grupos

sulfônicos, que têm a capacidade de se ligar eletrostaticamente às proteínas das células fixadas com ácido tricloroacético (TCA) e fornecer uma avaliação colorimétrica (73–75).

Depois dos 30 minutos, o excesso de corante foi removido através de quatro lavagens com ácido acético a 1% e a placa foi deixada a secar à temperatura ambiente. Por fim adicionou-se Tris-Base 10mM a cada poço para que o corante ligado as proteína fosse dissolvido, para de seguida se medir a absorvância dos poços a 490 nm no leitor de placas *Thermo Scientific Varioskan® Flash*. Os valores da densidade ótica obtidos com o espectrofotometro foram tratados com recurso ao *Graphpad®* (73–75).

3.5. Ensaio de formação de colónias

O ensaio de formação de colónias foi usado para avaliar a sobrevivência celular e a capacidade de cada célula sofrer divisão “ilimitada” baseado na capacidade de uma única célula de crescer em uma colónia. Este ensaio in vitro é bastante versátil e também pode ser usado para determinar a eficácia de agentes citotóxicos (76). Procedeu-se a diluições sucessivas até obter 500 células A549 e 1000 células PC-9 que foram plaqueadas por poço em placas de 6 poços. Após 48 horas foi administrado 100 µM de 3,5-DHBA e 20 mM 3-OBA aos respetivos poços.

Lavou-se os poços com PBS frio e fixou-se as células com metanol frio durante 30 minutos a 4°C. De seguida as colónias foram coradas com cristal violeta 0,5% p/v dissolvido em etanol. O cristal violeta é um corante que consegue atravessar a membrana das células, ligando-se ao DNA e tornando as células violetas (60,76).

Após a coloração retirou-se o corante e lavou-se as placas com água e deixa-se secar à temperatura ambiente. Em último contou-se as colónias formadas e procedeu-se à análise dos resultados.

3.6. Ensaio de migração celular por *Wound healing*

O ensaio de migração celular, ou ensaio de “*Wound healing*” foi utilizado para avaliar a migração celular e é frequentemente usado em testes de drogas e análise de células cancerígenas, pois é fácil de executar, barato e os resultados são reprodutíveis (77–79).

Neste ensaio plaqueou-se $1,5 \times 10^6$ células A549 e 5×10^5 células PC-9 por poço em placas de 6 poços e foram deixadas a aderir até atingir 100% de confluência. Quando as células já estavam aderidas ao poço em monocamada, foi realizada uma “ferida” (*Wound*) com o auxílio de uma ponta estéril de uma micropipeta de 200 µL, com o intuito de haver uma área livre de células, a fim de que haja a indução de migração nesse espaço vazio. De seguida retirou-se o sobrenadante, lavou-se os detritos celulares com PBS 1X e colocou-se DMEM completo juntamente com as drogas (100 µM 3,5-DHBA e

20 mM 3-OBA). Por fim monitorizou-se o fecho da ferida fotografando os poços às 0, 24, 48 e 72 horas por um microscópio invertido *Olympus*. O tamanho da ferida foi medido em cinco pontos aleatórios de cada tratamento em duplicado pelo programa *beWound*, e os dados apresentados são apresentados como a média \pm desvio padrão (70,77–79).

3.7. Ensaio de formação de esferóides

O ensaio de formação de esferóides foi usado para determinar a capacidade de crescimento das células tumorais em estruturas 3D, uma vez que esta conformação para além de ter a arquitetura dos tumores sólidos e de serem altamente reprodutíveis e padronizados, permite que as células tumorais mimetizem o MT (80).

Para iniciar este método colocou-se 100 μ L de agarose 1% por poço em placas de 96 poços e deixou-se solidificar. Depois plaqueou-se 5000 células nestas placas e levou-se a centrifugar a 1000 rpm durante 3 minutos para haver a formação do esferoide. Após 48 horas foram administrados os fármacos 3,5-DHBA (100 μ M) e 3-OBA (20 mM) aos poços que tinham esferóides e procedeu-se à captação de fotografias no microscópio durante 14 dias para ver o crescimento destes. Os fármacos foram renovados a cada 3 dias.

3.8. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando Graph Pad Prism versão 8.0.1.. Na análise estatística das diferenças entre os valores dos ensaios recorreu-se ao teste t-student e à análise de variância unidirecional one-way ANOVA. Todos os dados dos métodos estatísticos são relatados como média \pm desvio-padrão e as diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

4. Resultados

Como o nosso objetivo era estudar o papel do GPR81 em linhas celulares de cancro de pulmão de não pequenas células, foram realizados estudos *in vitro* em duas linhas celulares a A549 e a PC-9 onde se modelou a expressão deste recetor. Estudos preliminares não publicados do grupo, mostraram que ambas as linhas expressavam por qPCR o GPR81, sendo que a sua expressão seria mais elevada na linha PC-9. Assim, para melhor compreensão da atividade deste recetor nestas linhas, decidimos avaliar quer a sua ativação através da administração de 3,5-DHBA, quer a sua inibição através da administração de 3-OBA. De maneira a garantirmos que este recetor estaria ativo nestas células previamente à sua inibição, tratamos as células com o seu ativador endógeno. Assim adicionou-se 10 mM de lactato às células tratadas com 3-OBA, pois o lactato é o ligando endógeno do GPR81, e quando este está no meio ativa os recetores que estão na membrana (27–29).

Primeiro estudamos a concentração de droga a usar nos ensaios utilizando o ensaio da viabilidade com SRB com o agonista e com o inibidor do GPR81. Quando as A549 foram expostas às diferentes concentrações de 3,5-DHBA – 2, 5, 10, 50 e 100 μM – as células não apresentaram diferenças significativas no seu crescimento relativamente ao controlo (apenas DMSO) durante o tempo de estudo (Figura 3A). Ao passo que quando as células foram expostas às diversas concentrações de 3-OBA – 10, 20, 50 e 100 mM – não exibiram diferenças significativas na diminuição do crescimento celular em comparação com o controlo (com apenas NaCl) no decurso do tempo de estudo (Figura 3B). Para as PC-9 procedemos ao mesmo ensaio, nas mesmas condições, com as mesmas concentrações do 3,5-DHBA e 3-OBA. Quando colocamos as células PC-9 em cultura com 3,5-DHBA o crescimento das células relativamente ao controlo não é estatisticamente significativo durante as 72 horas (Figura 3C). Quando expostas ao 3-OBA as células PC-9 com concentrações mais elevadas do fármaco – 50 nM e 100 nM – tiveram uma diminuição significativa da viabilidade celular em comparação com o controlo nas 72 horas de estudo (Figura 3D). Com base nestes resultados e com as informações da literatura determinamos uma concentração fixa a usar de cada fármaco nos ensaios seguintes. Escolhemos usar a concentração de 100 μM de 3,5-DHBA, uma vez que, e a concentração de 20 mM de 3-OBA, pois era a concentração onde não havia morte celular

A549

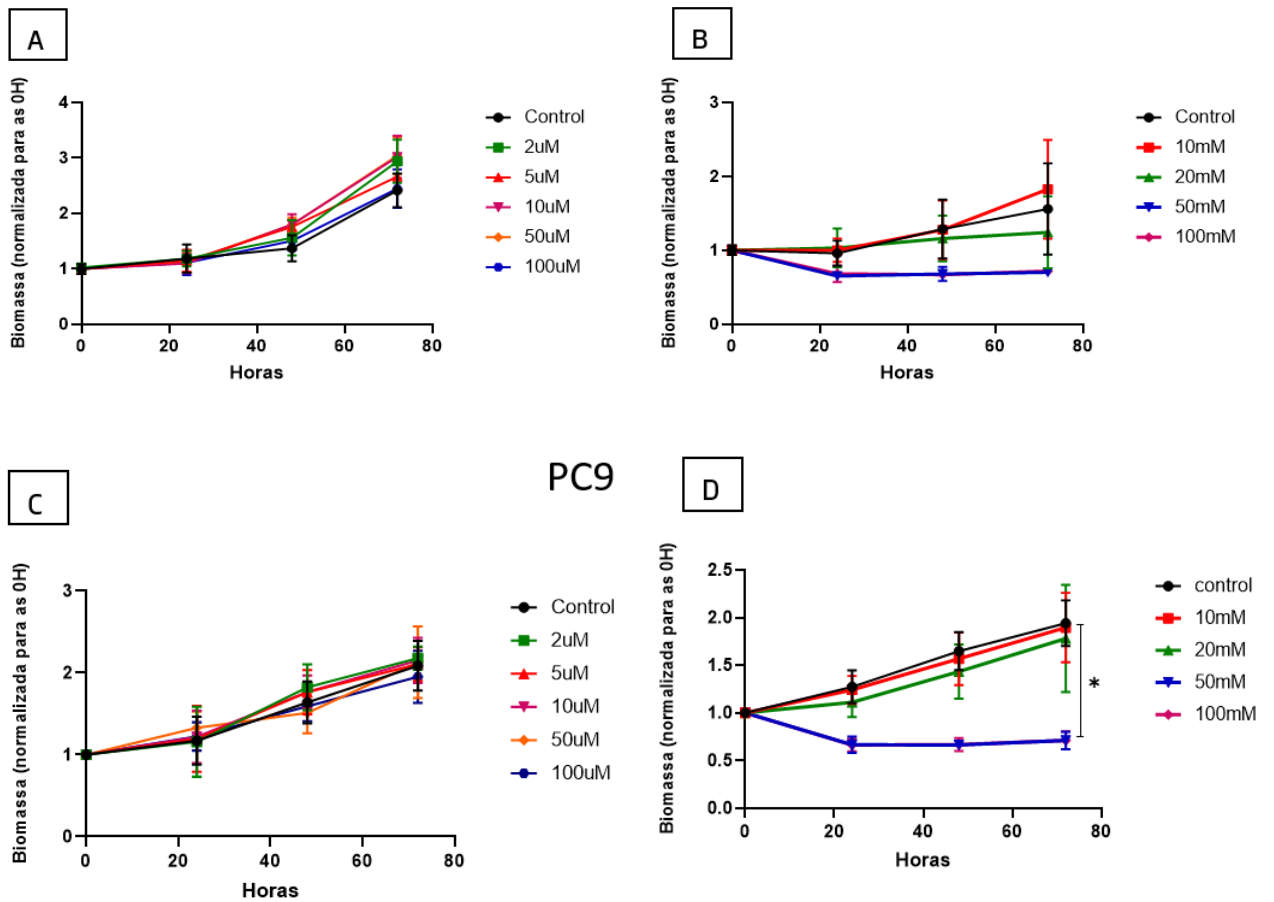


Figura 3 - Ensaio de viabilidade celular da linha A549 e da linha PC-9. A e C) Ensaio SRB nas células A549 e PC-9, respectivamente, tratadas com diferentes concentrações de 3,5-DHBA. Resultados têm três ensaios independentes. B e D) Ensaio SRB nas células A549 e PC-9, respectivamente, tratadas com diferentes concentrações de 3-OBA e 10 mM de lactato em DMEM com 1% P/S e 1% FBS. Resultados têm dois ensaios independentes. Os resultados são exibidos como média \pm desvio-padrão. Foi aplicado o método estatístico one-way ANOVA ($p < 0,05$).

Para avaliar a ação destes inibidores na expressão do GPR81 utilizamos a técnica de WB. Pela análise da imagem 4A, verificamos que ao administrar o agonista às células A549 havia um aumento da expressão da proteína relativamente ao veículo ($p=0,0327$) e quando se adicionava o inibidor às células verificava-se uma diminuição da expressão da proteína em comparação com as células tratadas com NaCl ($p=0,0044$). Na linha celular PC-9 verificou-se o mesmo que acontecia nas A549, ou seja, havia um aumento da expressão da proteína nas células tratadas com o agonista, 3,5-DHBA ($p=0,0015$), e uma diminuição nas células tratadas com o inibidor, 3-OBA ($p=0,0010$) (Figura 4B).

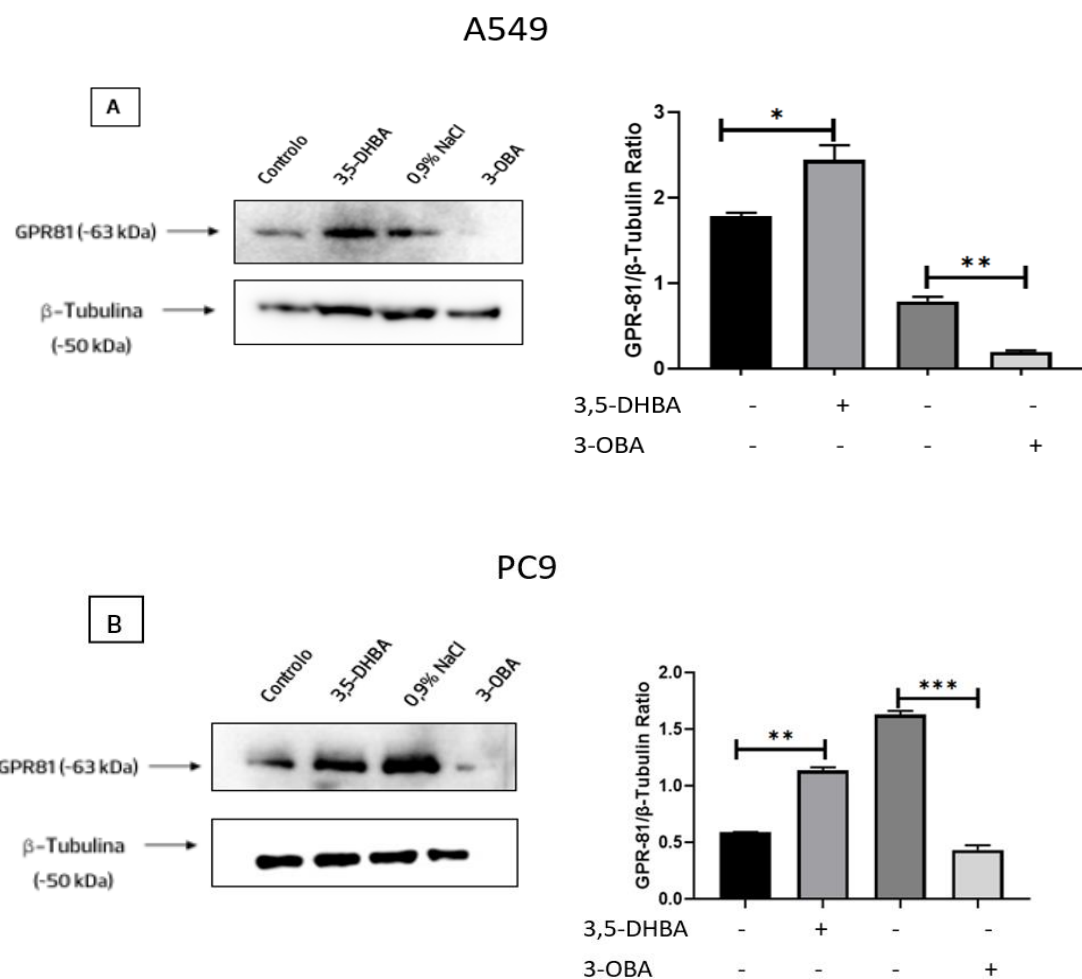


Figura 4 – Análise de Western Blotting da linha A549 e da linha PC-9. A) WB da linha A549; B) WB da linha A549; O gráfico à direita é a representação quantitativa dos resultados do WB, normalizado para a β -Tubulina. A β -Tubulina é uma proteína presente em vários tipos de células nos microtúbulos e é utilizada como controlo interno no WB para garantir que todos os poços contêm a mesma carga de proteína. Resultados têm dois ensaios independentes com duas réplicas cada. Os resultados são exibidos como média \pm desvio-padrão. Foi aplicado o método estatístico t-student (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

De modo a avaliar o papel do GPR81 no comportamento das linhas celulares de cancro de pulmão de não pequenas células fomos analisar a proliferação celular, através dos ensaios de formação de colónias e culturas 3D e a migração celular pela técnica de *wound healing* após ativação e inibição do recetor em ambas as linhas.

Para ver o efeito da ativação de GPR81 na migração celular incubamos as células com 100 μ M de 3,5-DHBA e para controlo incubamos com o respetivo veículo. Relativamente às A549 durante as 72 horas que observamos a cicatrização da ferida, não houveram diferenças significativas em nenhum tempo de estudo entre as duas condições (Figura 5A). Para as PC-9 observamos que as células às 24 horas não apresentam diferenças na percentagem de fecho da ferida, mas às 48 horas após a administração do fármaco houve um aumento significativo do encerramento da lesão nas células tratadas com o agonista ($p < 0,0001$). Às 72 horas a ferida estava cicatrizada nas duas condições (Figura 5B).

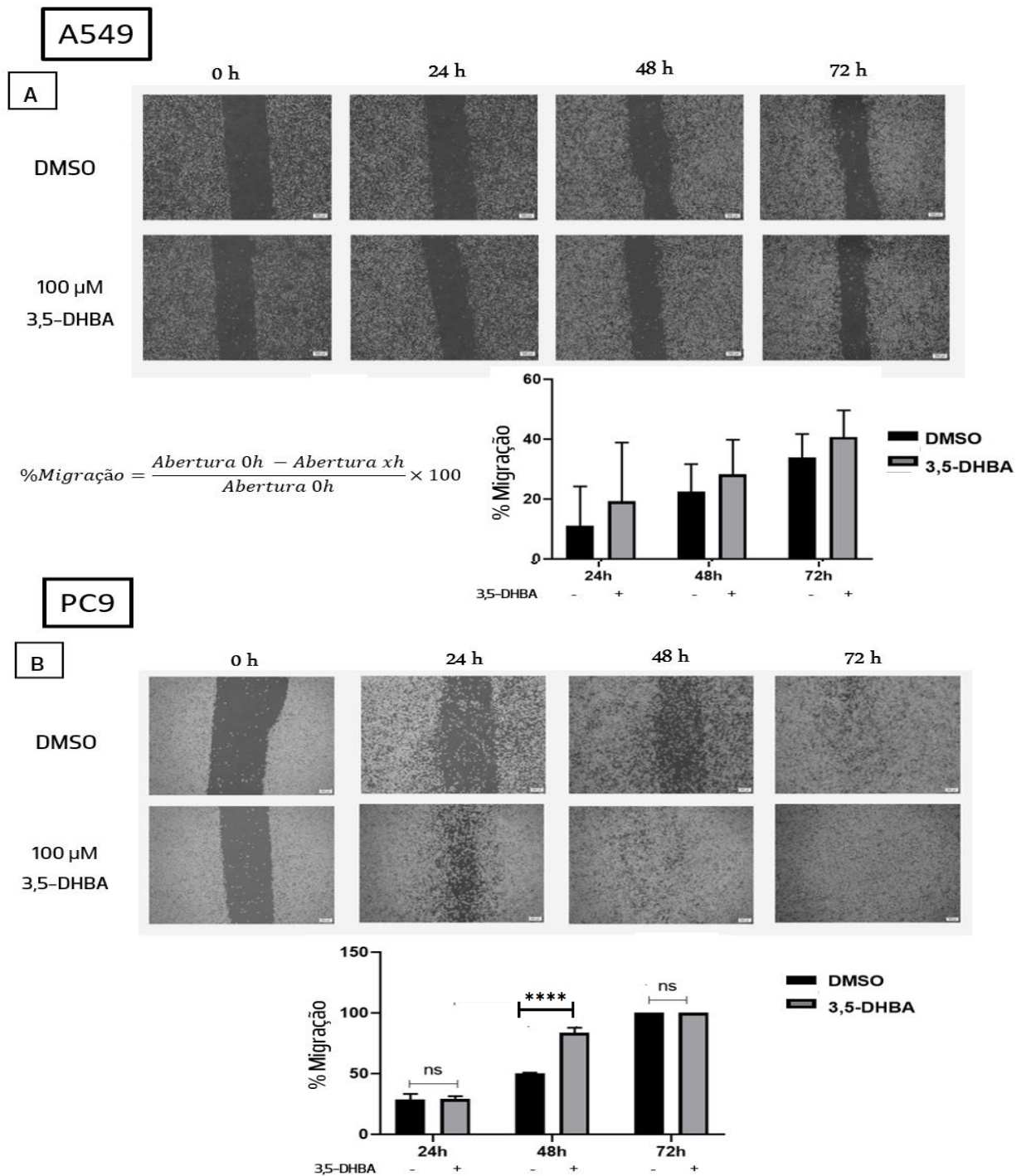


Figura 5 – Percentagem de migração. A e B) Nas células A549 e PC-9, respectivamente, tratadas com DMSO e 100 μM 3,5-DHBA em três tempos diferentes (24, 48 e 72 horas). Resultados têm três ensaios independentes com duas réplicas cada. Os resultados são exibidos como média ± desvio-padrão. Foi aplicado o método estatístico one-way ANOVA (**** p<0.0001; ns: não significativo).

No sentido de averiguar o efeito da inibição pelo 3-OBA ambas as linhas celulares foram incubadas em 2 condições diferentes: com NaCl 0,9% + 10mM lactato e com 20 mM de 3-OBA + 10mM lactato. Na linha A549 nas 72 horas de estudo, não houveram diferenças na migração entre as células

tratadas com o inibidor e as células tratadas com NaCl (Figura 6A). Quanto às PC-9, nas primeiras 24 horas não houveram diferenças na migração entre as células tratadas com NaCl e as tratadas com 3-OBA, porém às 48 horas houve uma diferença de fecho de cerca de 20% ($p < 0,0001$) entre as células tratadas com NaCl e as células tratadas com 3-OBA (Figura 6B).

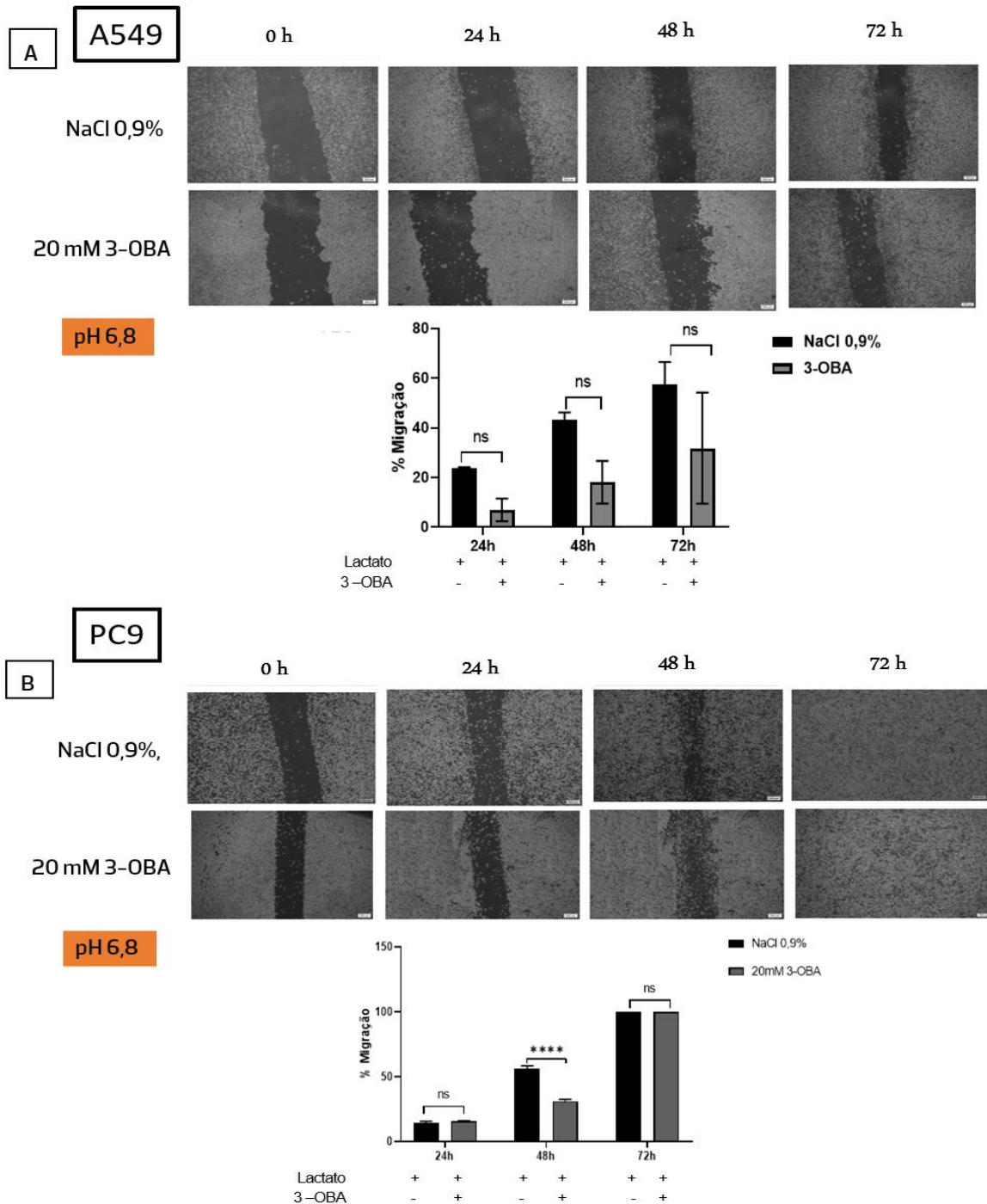


Figura 6 - Percentagem de migração. A e B) Nas células A549 e PC-9, respetivamente, tratadas com NaCl 0,9% + 10 mM lactato e 20 mM 3-OBA + 10 mM lactato com pH de 6,8 em três tempos diferentes (24, 48 e 72 horas). Resultados têm dois ensaios independentes com duas réplicas cada. Os resultados são exibidos como média \pm desvio-padrão. Foi aplicado o método estatístico one-way ANOVA (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$; ns: não significativo).

A adição de 10 mM de lactato ao meio juntamente com o inibidor levou a uma alteração do pH do meio para 6,8 o que pode influenciar a agressividade tumoral – como o aumento da migração celular como previamente demonstrado no trabalho elaborado por *Lee et al.* (81) . Assim e de modo a inferir sobre a ação do inibidor independentemente da ação da acidificação do meio, realizamos o ensaio a pH 7,4. Nas A549 não houveram diferenças na migração celular às 24 e 48 horas entre as células tratadas com 3-OBA e as células tratadas com o veículo. Já às 72 horas o fármaco inibe a migração da linha celular em cerca de 10% ($p=0,0102$) (Figura 7A). Quanto às PC-9, às 24 horas houve uma diferença de cerca de 25% ($p=0,0014$) na cicatrização da ferida comparando as células tratadas com o veículo e as tratadas com 3-OBA. Às 48 horas as células tratadas com o inibidor tiveram novamente uma percentagem menor no encerramento da ferida em comparação com as tratadas com NaCl ($p=0,0242$). Às 72 horas não há diferenças na migração celular entre as duas condições (Figura 7B).

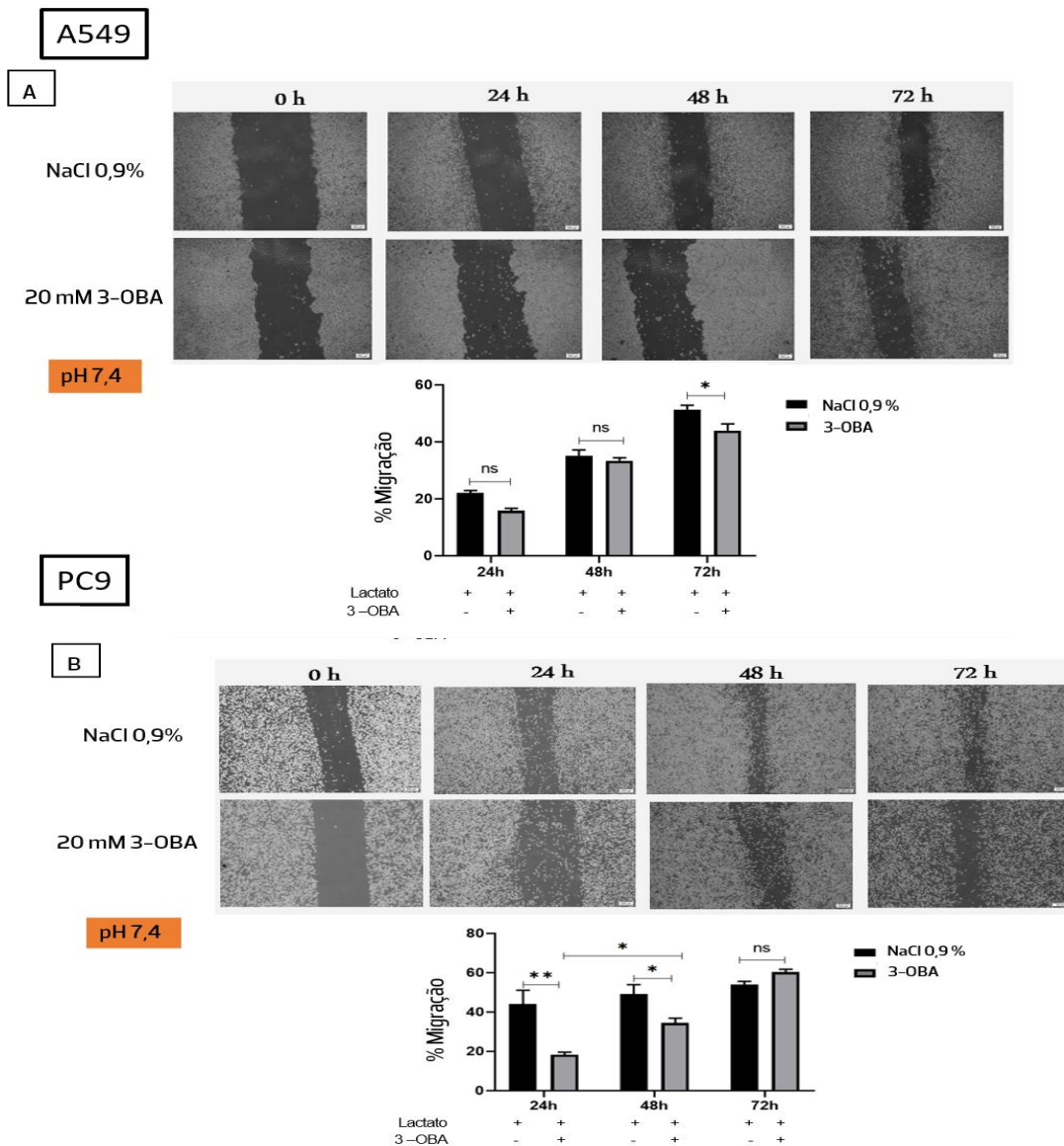


Figura 7 – Percentagem de migração. A e B) Nas células A549 e PC-9, respetivamente, tratadas com NaCl 0,9% + 10 mM lactato e 20 mM 3-OBA + 10 mM lactato com pH de 7,4 em três tempos diferentes (24, 48 e 72 horas). Resultados têm dois ensaios independentes com duas réplicas cada. Os resultados são exibidos como média \pm desvio-padrão. Foi aplicado o método estatístico one-way ANOVA (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; ns: não significativo).

De seguida avaliamos o efeito da manipulação de GPR81 na capacidade de criação de colónias, usando as mesmas condições usadas para a migração celular. Para a linha A549, observamos que quando foi exposta ao agonista, não houve diferenças significativas no número de colónias formadas entre as duas condições (Figura 8A). Para a linha PC-9, também não houveram diferenças no número de colónias formadas quando expostas ao agonista (Figura 8B).

Quando as células A549 foram expostas ao inibidor, a pH 6,8, verificamos que o número de colónias formado era menor nas células expostas ao 3-OBA quando comparado com o número de colónias formado nas células tratadas com o veículo ($p=0,0159$) (Figura 8C). Para além da diferença no número de colónias formadas, o tamanho das colónias nas células tratadas com o inibidor era visivelmente menor quando comparado com o tamanho das colónias tratadas com o veículo. O mesmo resultado foi verificado a pH 7,4 ($p=0,0141$) (Figura 8E). Relativamente às PC-9, averiguamos que o número de colónias formado era também menor nas células tratadas com o inibidor quando comparávamos o número de colónias formado nas células tratadas com o veículo ($p=0,0110$) (Figura 8D). O resultado foi o mesmo a pH 7,4 ($p=0,0162$) (Figura 8F)

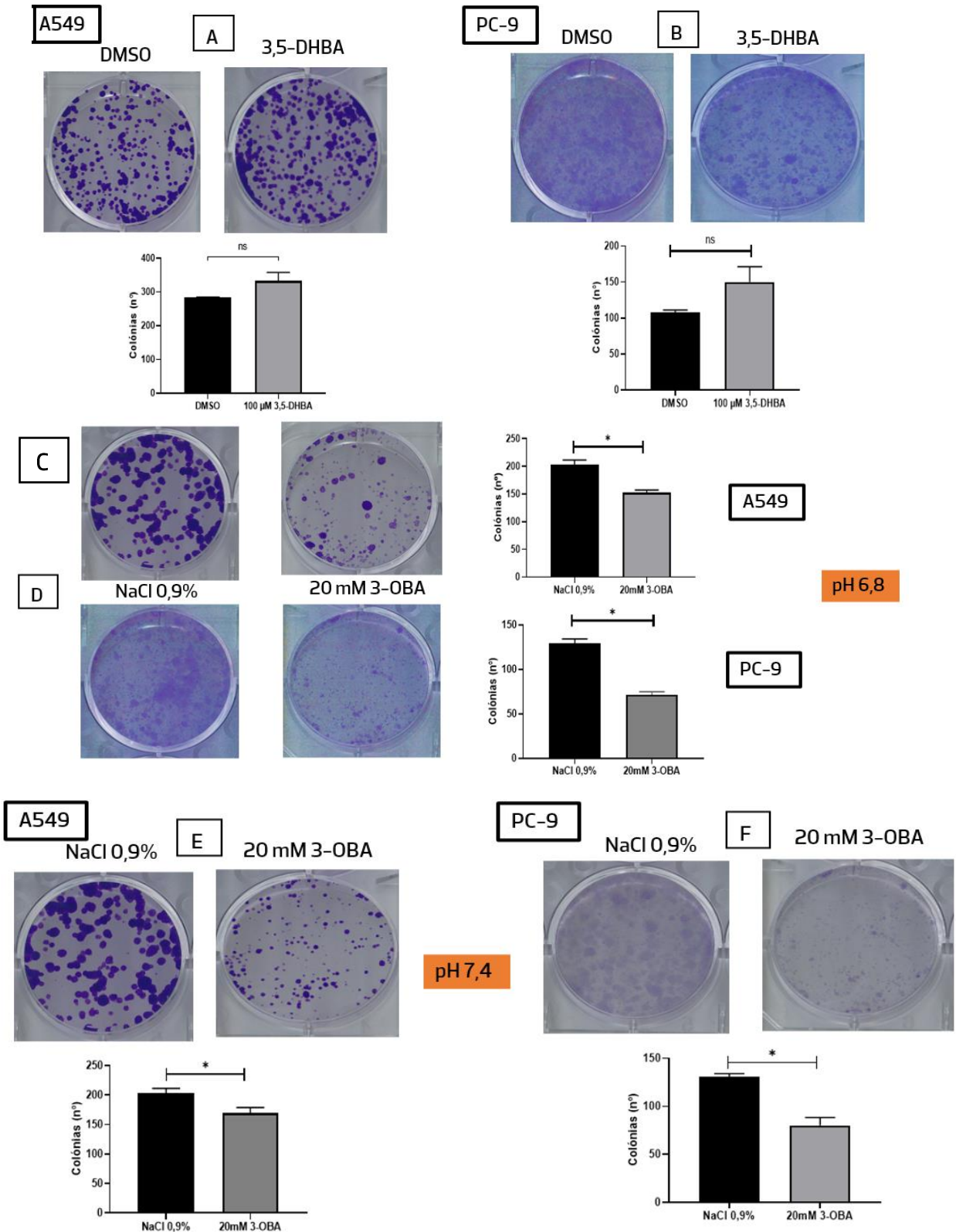


Figura 8 – Número de colónias formado na linha celular A549 e PC-9. A e B) Número de colónias nas células A549 e PC-9, respetivamente, tratadas com 100 μM 3,5-DHBA. C e D) Número de colónias nas células A549 e PC-9, respetivamente, tratadas com 20 mM de 3-OBA com pH de 6,8; E e F) Número de colónias nas células A549 e PC-9, respetivamente, tratadas com 20 mM de 3-OBA com pH de 7,4. Resultados têm dois ensaios independentes com duas réplicas cada. Os resultados são exibidos como média ± desvio-padrão. Foi aplicado o método estatístico t-student (* p < 0.05).

Por fim realizamos o ensaio de formação de esferóides para determinar se a administração do agonista e do inibidor influenciava a capacidade de crescimento das células tumorais em estruturas 3D. Depois da formação dos esferóides administramos 100 μM de 3,5-DHBA aos esferóides e tiramos fotografias a cada dois dias. A dose do agonista foi renovada a cada três dias. Comparando os esferóides A549 tratados com 3,5-DHBA e os tratados com DMSO, não observamos diferenças significativas no tamanho dos esferóides ao fim de 7 dias (Figura 9A). Em relação às PC-9, no segundo dia após a formação dos esferóides, os esferóides das células tratadas com DMSO eram maiores que os das células tratadas com 3,5-DHBA ($p=0,0259$), porém ao quarto dia o tamanho dos esferóides eram semelhantes entre as duas condições e o tamanho manteve-se semelhante ao sétimo dia (Figura 9B).

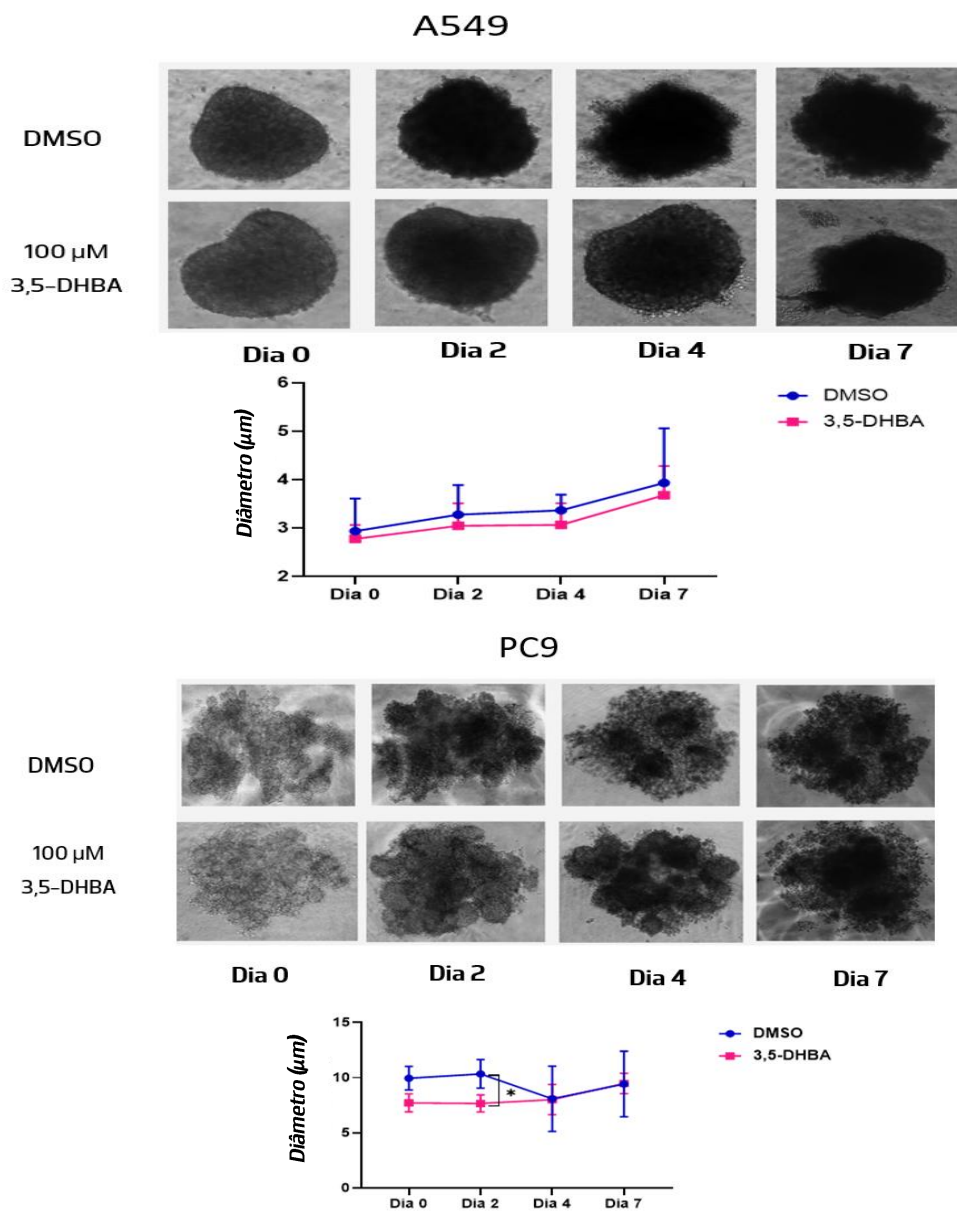


Figura 9 – Análise da formação de esferóides da linha A549 e da linha PC-9 tratadas com 100 μM 3,5-DHBA. A) esferóides da linha A549 quando tratados com 100 μM 3,5-DHBA; B) esferóides da linha PC-9 quando tratados com 100 μM 3,5-DHBA; Resultados têm dois ensaios independentes com doze réplicas cada. Os resultados são exibidos como média \pm desvio-padrão. Foi aplicado o método estatístico one-way ANOVA (* $p < 0.05$).

Quando tratadas com 20 mM de 3-OBA as A549 apenas tiveram uma diminuição significativa do tamanho dos esferóides ao quarto dia ($p < 0.0001$), que foi eliminada ao sétimo dia (Figura 10A). Já as PC9 tiveram uma diminuição dos esferóides formados nas células tratadas com o veículo ao quarto dia ($p = 0,0115$), mas ao sétimo dia não havia diferenças significativas entre os esferóides (Figura 10B).

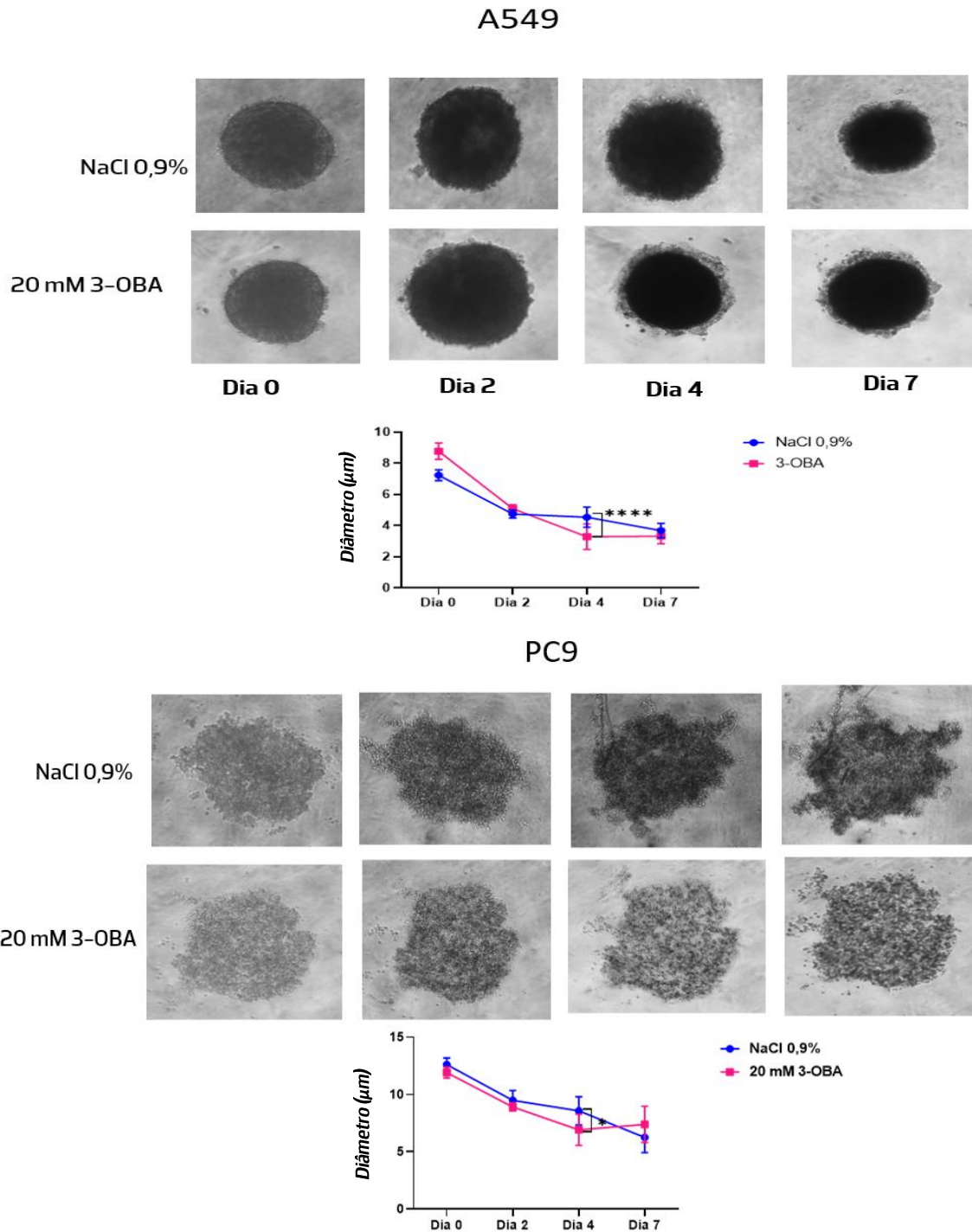


Figura 10 - Análise da formação de esferóides da linha A549 e da linha PC-9 quando tratadas com 20 mM 3-OBA. A) esferóides da linha A549 quando tratados com 20 mM de 3-OBA; B) esferóides da linha PC-9 quando tratados com 20 mM de 3-OBA; Resultados têm dois ensaios independentes com doze réplicas cada. Os resultados são exibidos como média \pm desvio-padrão. Foi aplicado o método estatístico one-way ANOVA (* $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$).

5. Discussão

As recentes descobertas sobre os recetores acoplados à proteína G terem a capacidade de estabelecerem e manterem um microambiente tumoral capaz de ajudar à iniciação e progressão tumoral aumentou o interesse em estudar este tipo de recetores em células tumorais *in vitro*.

Sabendo que quando o GPR81 está ativo em células de cancro de pulmão desencadeia vias de sinalização intracelular capazes de levar ao crescimento tumoral, evasão imune e metástases o nosso objetivo de estudo foi saber qual é o papel do GPR81 em duas linhas celulares de cancro de pulmão de não pequenas células, as A549 e as PC-9 (49,56,57). Para isso estimulamos com 3,5-DHBA e inibimos com 3-OBA o GPR81. O 3,5-DHBA é um agonista específico do GPR81, já o papel do 3-OBA na inibição do GPR81 tem sido questionada nos últimos meses por investigadores (82,87) que afirmam que esta droga não é um inibidor comprovado de GPR81, uma vez que, quase todos os ensaios realizados com 3-OBA não possuem outros experimentos para comprovar a atividade antagónica do 3-OBA contra os mecanismos de sinalização mediados pelo GPR81, baseando-se apenas em artigos que afirmam que o 3-OBA é um inibidor do GPR81. O 3-OBA é o ligando do GPR109A, um recetor de niacina, que partilha 52% da sua sequência de aminoácidos com o GPR81, e que funciona como supressor tumoral. Ao usar o 3-OBA podemos então estar a amplificar a expressão do GPR109A e não efetivamente a inibir o efeito do GPR81 (57,83,87). Mas como não há conhecimento até ao dia atual de um inibidor específico para o GPR81 e aquando do início deste trabalho, o artigo em questão ainda não tinha sido publicado, utilizamos na mesma o 3-OBA para os ensaios de inibição.

Com base nesse objetivo, fomos estudar a dose ideal dos fármacos para administrar às células através do ensaio de Sulforodamina B. Recorrendo à literatura estabelecemos 5 concentrações de 3,5-DHBA (2, 5, 10, 50 e 100 μM) e 4 concentrações de 3-OBA (10, 20, 50 e 100 mM) para testar a viabilidade das células (83,84). Os resultados obtidos, mostraram que 3,5-DHBA não influenciava a taxa de crescimento nas concentrações estudadas, porém o 3-OBA conseguia provocar um decréscimo da biomassa logo às 24 horas em ambas as células, estando apenas estatisticamente diminuído nas células PC-9 para as concentrações de 50 e 100 mM de 3-OBA (Figura 3A-D). Escolhemos então prosseguir os restantes estudos com a dose mais elevada de 3,5-DHBA testada (100 μM) e com 20 mM de 3-OBA, que era a concentração que não alterava a viabilidade das células até às 72 horas. Os resultados obtidos na viabilidade celular das células tratadas com o 3-OBA estão concordantes com os relatados na literatura, visto que, nos artigos a viabilidade celular começava a diminuir entre 15-20 mM (84). Relativamente ao 3,5-DHBA esperava-se que houvesse um ligeiro aumento na viabilidade celular pelo menos nas células tratadas com 100 μM 3,5-DHBA já que a concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo (EC_{50}) é de aproximadamente 150 μM (83).

Depois de determinar a dose dos fármacos, fomos ver se as doses escolhidas realmente conseguiam influenciar a expressão do GPR81 a nível da proteína. Sabendo que o 3,5-DHBA imita os efeitos do lactato e que o 3-OBA imita o efeito do knockout do GPR81 esperávamos que ao administrar os fármacos a expressão de GPR81 aumentasse nas células tratadas com o agonista e diminuísse nas tratadas com o inibidor (50-53). Os nossos resultados corroboram os artigos expostos, visto que, as células que continham 3,5-DHBA tiveram mais expressão de GPR81 em comparação com as tratadas com DMSO e as que continham 3-OBA tiveram uma diminuição da expressão em comparação com as células tratadas com NaCl 0,9% (Figura 4A e B). Estes resultados estão concordantes com a literatura uma vez que quando há a ativação de GPR81 pelo agonista há a formação de mensageiros secundários que levam à diminuição da produção de cAMP provocando a estimulação da expressão de GPR81. O contrário ocorre quando há a administração de 3-OBA, ou seja, ocorre a diminuição da ativação de GPR81 que causa o aumento de cAMP, resultando na diminuição da expressão de GPR81 (40,85).

Resultados de estudos elaborados em linhas de cancro da mama, em carcinoma pancreáticos e em carcinomas hipofaríngeos, mostraram que o knockdown do GPR81 reduzia a proliferação e invasão celular, levando à morte celular *in vitro*, e que altos níveis de expressão do GPR81 levava ao aumento da proliferação celular e angiogénese (35,45,82). Estudos em cancro do pulmão ainda não são conhecidos. Ao contrário do esperado, quando realizamos o ensaio de migração nas A549 com o agonista (Figura 5A) e com o inibidor com pH de 6,8 (Figura 6A) não há diferenças na migração em nenhuma das condições, apenas há uma ligeira diminuição na migração das células tratadas com 3-OBA a pH 7,4 às 72 horas após administração do inibidor (Figura 7A). Já nas PC-9 há um aumento da migração celular nas células tratadas com o 3,5-DHBA (Figura 5B) e uma diminuição da migração celular nas células tratadas com o 3-OBA tanto a pH 6,8 (Figura 6B) como a pH 7,4 (Figura 7B). Estes resultados mostram que ambas as linhas têm diferentes comportamentos quanto à migração quando expostas às drogas, sendo que as PC-9 exibem um comportamento mais semelhante ao esperado. Isto pode ser explicado devido à expressão basal de GPR81 ser mais baixa nas células A549.

Sabendo que a sobrevivência celular depende da expressão de GPR81 (56), realizamos o ensaio de formação de colónias. Comprovando o que está descrito na literatura, a inibição da função do GPR81 levou a que houvesse uma diminuição do número e do tamanho das colónias formadas, ou seja, levou a uma diminuição da sobrevivência celular. Já o agonista não provocou qualquer alteração na sobrevivência celular (Figura 8A-D). Estes resultados podem ser explicados pelo facto de que a diminuição do GPR81 afeta negativamente a sobrevivência e o crescimento celular uma vez que este recetor é essencial para as células tumorais, mas a sobreexpressão do recetor pode não influenciar a sobrevivência celular.

Como exposto anteriormente, a adição de lactato ao meio torna-o mais ácido o que pode influenciar a agressividade tumoral (81,82). Tendo isto em conta, deveríamos ter elaborado os ensaios

usado como controlo para o efeito do lactato células sem qualquer fármaco nem lactato, mas com o pH do meio em 6,8 e 7,4 para averiguar se o lactato influenciava de algum modo estes ensaios.

Por fim, considerando que o GPR81 tem um papel vital no crescimento e metabolismo celular, elaboramos o ensaio de formação de esferóides (55). Verificamos que o agonista não teve a capacidade de formar esferóides maiores em nenhuma das linhas celulares, porém o inibidor conseguiu diminuir o metabolismo celular e com isso diminuir o crescimento dos esferóides (Figura 9A e B).

Os esferóides formados nas células PC-9 não são uma estrutura só, são mais um conjunto de microesferóides agrupados uns aos outros. Este pormenor pode influenciar a ação dos fármacos, e, portanto, seria de grande interesse elaborar outras técnicas para avaliar o crescimento celular, como o ensaio de *"hanging drop"*. Este ensaio baseia-se na formação de esferóides multicelulares com tamanho e forma consistentes em placas de Petri. Para isso basta colocar a suspensão celular em forma de gotas na placa de Petri, e as células devido à densidade e tensão superficial vão-se agregar espontaneamente e originar um esferóide que tem uma reprodutibilidade de quase 100% (86).

No presente estudo, o tratamento com 3-OBA demonstrou um efeito anti-tumoral significativo nas linhas celulares A549 e PC-9, pondo em causa os investigadores que dizem que o 3-OBA não é um inibidor do GPR81 (82). No entanto o tratamento com 3,5-DHBA não provocou grandes alterações em quase nenhum dos ensaios realizados, só influenciou positivamente a migração das células PC-9. Isto vai contra o que era suposto ocorrer, uma vez que a estimulação do GPR81 deveria aumentar a proliferação celular.

Para afirmar que estes efeitos eram mesmos provocados pela manipulação farmacológica do GPR81, no futuro pode-se recorrer a técnicas de manipulação genética, usando para isso por exemplo RNA de interferência, e realizar os mesmos ensaios nas mesmas condições. Se caso os resultados fossem concordantes poder-se-ia ainda utilizar as células tratadas com 3,5-DHBA e 3-OBA em modelos animais imunocomprometidos para que não houvesse a rejeição das células tumorais humanas, e assim verificar se os resultados eram os mesmos ou se eram influenciados pelos restantes mecanismos existentes *in vivo*. Além destas hipóteses, poder-se-ia utilizar outro tipo de linhas celulares que expressem bastante GPR81, como linhas celulares de cancro da mama ou outras linhas de cancro de pulmão que expressem mais GPR81 que as PC-9, e comparar os resultados obtidos de modo a verificar se a expressão basal afeta ou não os efeitos na proliferação tumoral. Por fim, ainda era possível realizar ensaios de imuno-histoquímica em tecidos parafinados de pacientes com cancro de pulmão para averiguar se a expressão de GPR81 esta relacionada com o estadio do cancro.

No futuro, quando houver mais estudos clínicos sobre o efeito do GPR81 em cancro de pulmão, talvez se consiga combater a propagação tumoral através da inibição do GPR81, para isso recorrendo a fármacos que consigam aumentar os níveis de cAMP intracelular ao ponto de as vias de sinalização intracelular que levam ao crescimento tumoral estarem inibidas.

6. Conclusão

Nesta tese de mestrado tivemos a oportunidade de trabalhar com um recetor essencial para o crescimento tumoral e verificar as consequências da estimulação e inibição deste.

Uma vez que a expressão basal de GPR81 nas duas linhas celulares era discrepante, foi essencial usar as duas para ver o efeito do agonista e do inibidor. Quando as A549 foram tratadas com o agonista não houve diferenças na migração celular, na sobrevivência celular e nem no crescimento celular. Já as PC-9 conseguiram ter um aumento na migração, mas na sobrevivência celular e no crescimento celular tiveram um comportamento idêntico às células tratadas com o veículo. Podemos concluir então que mesmo que a migração seja maior nas células que expressam mais GPR81 basalmente quando expostas ao agonista, os restantes resultados não apresentam diferenças significativas. Já quando são tratadas com o 3-OBA, há uma diminuição da migração, da sobrevivência e do crescimento celular em ambas as linhas independentemente do pH.

Com isto podemos concluir que efetivamente o GPR81 têm um efeito na proliferação tumoral especialmente quando o recetor é inibido farmacologicamente. Quando a sua expressão é estimulada os resultados são idênticos aos das células tratadas com o veículo, evidenciando que o aumento da expressão do recetor não afeta positivamente a proliferação tumoral *in vitro*.

Esta dissertação forneceu informações importantes sobre as consequências da inibição do GPR81, de forma a que no futuro novos estudos em cancro do pulmão e tratamentos possam surgir para que haja a inibição do recetor de maneira a que os pacientes com adenocarcinoma pulmonar possam ser tratados.

Referências Bibliográficas

1. Gridelli C, Rossi A, Carbone DP, Guarize J, Karachaliou N, Mok T, et al. Non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Prim.* 2015;1:1–16.
2. Hespanhol V, Parente B, Araújo A, Cunha J, Fernandes A, Figueiredo MM, et al. Lung cancer in Northern Portugal: A hospital-based study. *Rev Port Pneumol (English Ed.* 2013;19(6):245–51.
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
4. Inamura K, Ninomiya H, Ishikawa Y, Matsubara O. Is the epidermal growth factor receptor status in lung cancers reflected in clinicopathologic features? *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(1):66–72.
5. Globocan. Lung Fact Sheet. *Obs Glob do Câncer [Internet].* 2020;419:1–2. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>. Acessado em 26/10/2022
6. de Groot PM, Wu CC, Carter BW, Munden RF. The epidemiology of lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2018;7(3):220–33.
7. McIntyre A, Ganti AK. Lung cancer—A global perspective. *J Surg Oncol.* 2017;115(5):550–4.
8. Wheless L, Brashears J, Alberg AJ. Epidemiology of lung cancer. *Lung Cancer Imaging.* 2013;1–15.
9. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. Review The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nat Publ Gr.* 2018;
10. GUERREIRO T, ANTUNES L, BASTOS J, MAYER A, FORJAZ G, ARAUJO A, et al. Lung cancer: A nationwide study to characterize sex differences, incidence, and spatial patterns in portugal. *In Vivo (Brooklyn).* 2020;34(5):2711–9.
11. World Health Organization. Portugal – Global Cancer Observatory. *Globocan 2020 [Internet].* 2020;501:1–2. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/620-portugal-fact-sheets.pdf>. Acessado em 27/10/2022. Acessado em 27/10/2022
12. Schabath MB, Cote ML. Cancer progress and priorities: Lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019;28(10):1563–79.
13. Tartarone A, Lerosé R, Aieta M. Focus on lung cancer screening. *J Thorac Dis.*

- 2020;12(7):3815–20.
14. Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J*. 2016;48(3):889–902.
 15. Wadowska K, Bil-Lula I, Trembecki Ł, Śliwińska-Mossoń M. Genetic markers in lung cancer diagnosis: A review. *Int J Mol Sci*. 2020;21(13):1–24.
 16. Araujo LH, Horn L, Merritt RE, Shilo K, Xu-Welliver M, Carbone DP. *Cancer of the Lung: Non-Small Cell Lung Cancer and Small Cell Lung Cancer*. Sixth Edit. *Abeloff's Clinical Oncology*. Elsevier Inc.; 2019. 1108–1158.e16 p.
 17. Inamura K. Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Front Oncol*. 2017;7(AUG):1–7.
 18. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2019;94(8):1623–40.
 19. Ferone G, Lee MC, Sage J, Berns A. Cells of origin of lung cancers: Lessons from mouse studies. *Genes Dev*. 2020;34(16):1017–32.
 20. Manuel V, Sousa L De, Carvalho L. Heterogeneity in Lung Cancer. 2018;96–107.
 21. Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2009;459(7245):356–63.
 22. Liu Y, An S, Ward R, Yang Y, Guo XX, Li W, et al. G protein-coupled receptors as promising cancer targets. *Cancer Lett*. 2016;376(2):226–39.
 23. Venkatakrishnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Madan Babu M. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2013;494(7436):185–94.
 24. Li J, Ning Y, Hedley W, Saunders B, Chen Y, Tindill N, et al. The Molecule Pages database. 2002;420(December):716–7.
 25. Ritter SL, Hall RA. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Dec;10(12):819–30.
 26. Leurs R, Bakker RA, Timmerman H, Esch IJP De. *REVIEWS THE HISTAMINE H 3 RECEPTOR*: 2005;4(February).
 27. Jin L, Guo Y, Chen J, Wen Z, Jiang Y, Qian J. Lactate receptor HCAR1 regulates cell growth, metastasis and maintenance of cancer - specific energy metabolism in breast cancer cells. 2022;1–9.
 28. Wellbourne-wood J, Briquet M, Alessandri M, Binda F, Touya M, Chatton JY. Evaluation of Hydroxycarboxylic Acid Receptor 1 (HCAR1) as a Building Block for Genetically

- Encoded Extracellular Lactate Biosensors. *Biosensors*. 2022;12(3):1–10.
29. Ranganathan P, Shanmugam A, Swafford D, Suryawanshi A, Bhattacharjee P, Hussein MS, et al. GPR81, a Cell-Surface Receptor for Lactate, Regulates Intestinal Homeostasis and Protects Mice from Experimental Colitis. *J Immunol*. 2018;ji1700604.
 30. Manicassamy S. *HHS Public Access*. 2019;200(5):1781–9.
 31. Brown TP, Ganapathy V. Lactate/GPR81 signaling and proton motive force in cancer: Role in angiogenesis, immune escape, nutrition, and Warburg phenomenon. *Pharmacol Ther*. 2020;206:107451.
 32. Kennedy LH, Glesaaen ER, Palibrk V, Pannone M, Wang W, Al-jabri AHJ, et al. Title : Lactate receptor HCAR1 regulates neurogenesis and microglia activation after neonatal hypoxia-ischemia Short running title : Lactate receptor HCAR1 regulates brain repair. 2020;
 33. Wagner W, Kania KD, Ciszewski WM. Stimulation of lactate receptor (HCAR1) affects cellular DNA repair capacity. *DNA Repair (Amst)*. 2017;52:49–58.
 34. Roland CL, Arumugam T, Deng D, Liu SH, Philip B, Gomez S, et al. Cell Surface Lactate Receptor GPR81 Is Crucial for Cancer Cell Survival. (19):5301–10.
 35. Jia Q, Xu O, Wang J, Dong J, Ren X, Jia X, et al. Effects of GPR81 silencing combined with cisplatin stimulation on biological function in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep*. 2020;22(3):1727–36.
 36. Stäubert C, Broom OJ, Nordström A. Hydroxycarboxylic acid receptors are essential for breast cancer cells to control their lipid/fatty acid metabolism. *Oncotarget*. 2015;6(23):19706–20.
 37. Roland CL, Arumugam T, Deng D, Liu SH, Gomez S, Burns WR, et al. survival. 2015;74(18):5301–10.
 38. Longhitano L, Vicario N, Tibullo D, Giallongo C, Broggi G, Caltabiano R, et al. Lactate Induces the Expressions of MCT1 and HCAR1 to Promote Tumor Growth and Progression in Glioblastoma. *Front Oncol*. 2022;12(April):1–18.
 39. Lundø K, Trauelsen M, Pedersen SF, Schwartz TW. Why Warburg Works: Lactate Controls Immune Evasion through GPR81. *Cell Metab*. 2020;31(4):666–8.
 40. Morland C, Lauritzen KH, Puchades M, Holm-Hansen S, Andersson K, Gjedde A, et al. The lactate receptor, G-protein-coupled receptor 81/hydroxycarboxylic acid receptor 1: Expression and action in brain. *J Neurosci Res*. 2015;93(7):1045–55.

41. Spencer NY, Stanton RC. The Warburg Effect, Lactate, and Nearly a Century of Trying to Cure Cancer. *Semin Nephrol.* 2019;39(4):380–93.
42. Cruz-lópez KG De, Castro-muñoz LJ. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. 2019;9(November).
43. Brown TP, Ganapathy V. Pharmacology & Therapeutics Lactate / GPR81 signaling and proton motive force in cancer : Role in angiogenesis , immune escape , nutrition , and Warburg phenomenon. *Pharmacol Ther.* 2020;206:107451.
44. Briquet M, Rocher AB, Alessandri M, Rosenberg N, de Castro Abrantes H, Wellbourne-Wood J, et al. Activation of lactate receptor HCAR1 down-modulates neuronal activity in rodent and human brain tissue. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2022;42(9):1650–65.
45. Ishihara S, Hata K, Hirose K, Okui T, Toyosawa S, Uzawa N, et al. The lactate sensor GPR81 regulates glycolysis and tumor growth of breast cancer. *Sci Rep.* 2022;12(1):1–14.
46. Xie Q, Zhu Z, He Y, Zhang Z, Zhang Y. BBA – Molecular Basis of Disease A lactate-induced Snail / STAT3 pathway drives GPR81 expression in lung cancer cells. *BBA – Mol Basis Dis.* 2020;1866(1):165576.
47. Abrantes XHDC, Briquet XM, Ce X, Restivo XL, Puyal XJ, Rosenberg XN. Meeting 30 July. 2019;39(23):4422–33.
48. Brown TP, Bhattacharjee P, Ramachandran S, Sivaprakasam S, Ristic B, Omar M, et al. The lactate receptor GPR81 promotes breast cancer growth via a paracrine mechanism involving antigen-presenting cells in the tumor microenvironment. *Oncogene.* 2020;
49. Lamberti G, Sisi M, Andriani E, Palladini A, Giunchi F, Lollini P, et al. The Mechanisms of PD-L1 Regulation in Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC): Which Are the Involved Players ? 2020;1–21.
50. Khatib-massalha E, Bhattacharya S, Massalha H, Biram A, Golan K, Kollet O, et al. Lactate released by inflammatory bone marrow neutrophils induces their mobilization via endothelial GPR81 signaling. *Nat Commun.* 2020;
51. Longhitano L, Forte S, Orlando L, Grasso S, Barbato A, Vicario N, et al. The Crosstalk between GPR81 / IGF6 Promotes Breast Cancer Progression by Modulating Lactate Metabolism and Oxidative Stress. 2022;1–14.
52. Development SE, Lee Y, Kim T, Kim Y, Kamada N, Gao N, et al. Microbiota-Derived Lactate Accelerates Intestinal Article Microbiota-Derived Lactate Accelerates

- Intestinal Stem-Cell-Mediated Epithelial Development. *Cell Host Microbe*. 2018;24(6):833–846.e6.
53. Scavuzzo CJ, Rakotavao I, Dickson CT. Neurobiology of Learning and Memory Differential effects of L- and D-lactate on memory encoding and consolidation : Potential role of HCAR1 signaling. 2020;168(November 2019).
 54. Wagner W, Ciszewski WM, Kania KD. L- and D-lactate enhance DNA repair and modulate the resistance of cervical carcinoma cells to anticancer drugs via histone deacetylase inhibition and hydroxycarboxylic acid receptor 1 activation. *Cell Commun Signal*. 2015;13(1):1–16.
 55. Biomolecules M, Stransky N, Huber SM. Comment on Chen et al . Dual Blockade of Lactate / GPR81 and PD-1 / PD-L1 Pathways Enhances the Anti-Tumor Effects of. 2022;2021–2.
 56. Feng J, Yang H, Zhang Y, Wei H, Zhu Z, Zhu B, et al. Tumor cell-derived lactate induces TAZ-dependent upregulation of PD-L1 through GPR81 in human lung cancer cells. *Oncogene*. 2017;36(42):5829–39.
 57. Ortiz-masia D, Barrachina MD. Metabolite Sensing GPCRs: Promising Therapeutic Targets for Cancer Treatment ? 2020;1–33.
 58. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, et al. In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors2. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 1973 Nov 1;51(5):1417–23.
 59. Swain RJ, Kemp SJ, Goldstraw P, Tetley TD, Stevens MM. Assessment of Cell Line Models of Primary Human Cells by Raman Spectral Phenotyping. *Biophysj*. 2010;98(8):1703–11.
 60. Maurya DK, Nandakumar N, Devasagayam TPA. Anticancer property of gallic acid in A549, a human lung adenocarcinoma cell line, and possible mechanisms. *J Clin Biochem Nutr*. 2011;48(1):85–90.
 61. Park M-Y, Jung MH, Eo EY, Kim S, Lee SH, Lee YJ, et al. Generation of lung cancer cell lines harboring EGFR T790M mutation by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Oncotarget*. 2017;8(22):36331–8.
 62. Koizumi F, Shimoyama T, Taguchi F, Saijo N, Nishio K. Establishment of a human non-small cell lung cancer cell line resistant to gefitinib. *Int J Cancer*. 2005;116(1):36–44.
 63. Hou T, Ma J, Hu C, Zou F, Jiang S, Wang Y, et al. Decitabine reverses gefitinib resistance

- in PC9 lung adenocarcinoma cells by demethylation of RASSF1A and GADD45 β promoter. 2019;12(11):4002–10.
64. Rafieepour A, Azari MR, Peirovi H, Khodaghohi F, Jaktaji JP, Mehrabi Y. Investigation of the effect of magnetite iron oxide particles size on cytotoxicity in A 549 cell line. 2019;35:703–13.
 65. Valk J Van Der, Brunner D, Smet K De, Svenningsen ÅF, Honegger P, Knudsen LE, et al. Toxicology in Vitro Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol Vitro*. 2010;24(4):1053–63.
 66. Valk J Van Der, Bieback K, Buta C, Cochrane B, Dirks WG. Fetal Bovine Serum (FBS): Past – Present – Future. 2018;35(1):99–118.
 67. Zhikhoreva AA, Belik VP, Belashov A V, Vasyutinskii OS. Spectral Characteristics of the DMEM Cell-Culture Medium. 2018;63(9):1344–7.
 68. Zhao W. Pen-strep influence macrophage mechanical property and mechano-response to microenvironment. 2020;
 69. Lobanovska M, Pilla G. Penicillin ' s Discovery and Antibiotic Resistance : Lessons for the Future ? 2017;90:135–45.
 70. Hiang TAINC. Involvement of the ERK Signaling Pathway in Fisetin Reduces Invasion and Migration in the Human Lung Cancer Cell Line. 2009;8933–41.
 71. Zhu Y, Shurlknight KL, Chen X, Sang S. Identification and pharmacokinetics of novel alkylresorcinol metabolites in human urine, new candidate biomarkers for whole-grain wheat and rye intake. *J Nutr*. 2014;144(2):114–22.
 72. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods*. 2006;38(4):283–93.
 73. Rédei GP. Chemosensitivity. *Encycl Genet Genomics, Proteomics Informatics*. 2008;110:326–326.
 74. Vajrabhaya L ongthong, Korsuwannawong S. Cytotoxicity evaluation of a Thai herb using tetrazolium (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays. *J Anal Sci Technol*. 2018;9(1).
 75. Kasinski AL, Kelnar K, Stahlhut C, Orellana E, Zhao J, Shimer E, et al. HHS Public Access. 2016;34(27):3547–55.
 76. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2315–9.
 77. Jonkman JEN, Cathcart JA, Xu F, Bartolini ME, Amon JE, Stevens KM, et al. Cell Adhesion

- & Migration An introduction to the wound healing assay using livecell microscopy An introduction to the wound healing assay using livecell microscopy. *Cell Adhes Migr*. 2014;8(5):440–51.
78. Pastar I, Liang L, Sawaya AP, Wikramanayake TC, Glinos GD, Drakulich S, et al. Preclinical models for wound-healing studies. *Skin Tissue Models*. Elsevier Inc.; 2017. 223–251 p.
 79. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*. 2007;2(2):329–33.
 80. Vinci M, Box C, Eccles SA. Three-dimensional (3D) tumor spheroid invasion assay. *J Vis Exp*. 2015;2015(99):1–9.
 81. Lee YJ, Shin KJ, Park SA, Park KS, Park S, Heo K, et al. G-protein-coupled receptor 81 promotes a malignant phenotype in breast cancer through angiogenic factor secretion. *Oncotarget*. 2016;7(43):70898–911.
 82. Jin L, Guo Y, Chen J, Wen Z, Jiang Y, Qian J. Lactate receptor HCAR1 regulates cell growth, metastasis and maintenance of cancerspecific energy metabolism in breast cancer cells. *Mol Med Rep*. 2022;26(2):1–9.
 83. Liu C, Kuei C, Zhu J, Yu J, Zhang L, Shih A, et al. 3,5-Dihydroxybenzoic Acid, a Specific Agonist for Hydroxycarboxylic Acid 1, Inhibits Lipolysis in Adipocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012 Jun 1;341(3):794 LP – 801.
 84. Chen S, Zhou X, Yang X, Li W, Li S, Hu Z, et al. Dual blockade of lactate/gpr81 and pd-1/pd-l1 pathways enhances the anti-tumor effects of metformin. *Biomolecules*. 2021;11(9):1–14.
 85. Sun J, Ye X, Xie M, Ye J. Induction of triglyceride accumulation and mitochondrial maintenance in muscle cells by lactate. *Sci Rep*. 2016;6(July):1–10.
 86. Chaicharoenaudomrung N, Kunhorm P, Noisa P. Author contributions: 2019;11(12):1065–84.
 87. Mohammad Nezhady MA and Chemtob S (2022) 3-OBA Is Not an Antagonist of GPR81. *Front. Pharmacol*. 12:803907