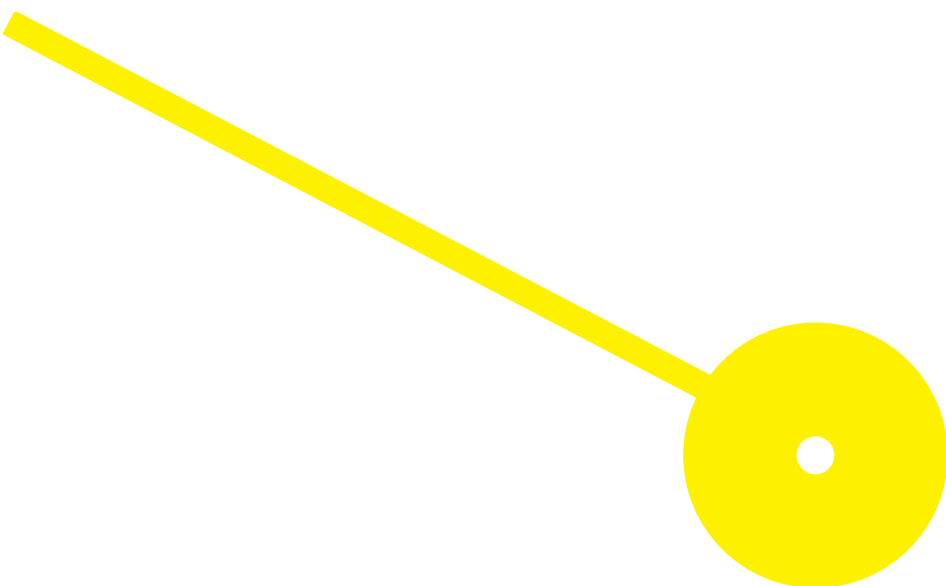




# Papel da CD147 no cancro do pulmão de não pequenas células

Sara Leonor Santos da Costa

10/2022





**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**



**ICVS//3B's**  
Associate  
Laboratory  
University of Minho

## **Papel da CD147 no cancro do pulmão de não pequenas células**

**Autor**

Sara Leonor Santos da Costa

**Orientador(es)**

Prof. Doutora Sara Granja/ Prof. adjunta da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto (ESS|P.PORTO) e Investigadora no Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde

Prof. Doutor Ricardo Ferraz/ Prof. coordenador da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto (ESS|P.PORTO)

**Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Mestrado em Bioquímica em Saúde – 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**

Queria começar por agradecer à minha orientadora Doutora Sara Granja, por me ter dado a oportunidade de realizar a minha tese num sítio incrível que foi o Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde. Obrigada pela grande paciência e por me ter acompanhado até ao final.

Aos meus amigos, por terem estado sempre presentes. Obrigada pelo vosso apoio e carinho.

Às minhas colegas de laboratório, principalmente à Sara Barbosa por me ter bem acolhido, e por toda a ajuda dada no laboratório. E a ti Margarida Silva, por nos teres feito rir com as tuas teorias. Nunca conheci ninguém tão calma como tu, e obrigada pela tua simpatia, divertimento e companhia.

À minha família, em particular aos meus pais, irmão e a ti Audrey, por me terem apoiado e acreditado que era capaz. Um muito obrigado por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida. Amo-vos muito!

Ao meu namorado, por ter tido a paciência de aturar o meu grande mau humor. Obrigada pelo teu amor, carinho e compreensão. Amo-te!

## Resumo

A CD147 é uma glicoproteína transmembranar, que está envolvida no metabolismo, e invasão das células cancerígenas, promove a metastização e angiogénese. No entanto, poucos estudos existem sobre o papel da CD147 na imunossupressão tumoral, sendo este o ponto chave desta tese. Para tal, a fim de perceber o papel da CD147 no cancro do pulmão, utilizou-se a linha celular de murganho LLC1 geneticamente manipulada para o bloqueio da CD147 e avaliou-se o impacto deste bloqueio na imunossupressão tumoral *in vivo*. A inibição da CD147 levou a uma diminuição no consumo de glicose, e um menor acúmulo de lactato extracelular. Porém, não se observaram diferenças no crescimento dos esferoides, nem na viabilidade celular. Em modelos *in vivo*, verificou-se que a inibição da CD147 levou a um aumento da proliferação celular nos tumores, avaliada pela marcação de PCNA por imunohistoquímica, e através da análise de citometria de fluxo, observou-se um aumento de expressão de PD-L1 nos macrófagos e uma diminuição significativa do marcador de ativação CD69 em células TCD8<sup>+</sup>. Em conclusão, este estudo sugere que a ausência da CD147 promove imunossupressão tumoral, no entanto são necessários mais estudos.

**Palavras-chave:** Cancro do pulmão, CD147, imunossupressão.

## **Abstract**

CD147 is a transmembrane glycoprotein, which is involved in metabolism, and invasion of cancer cells, promotes metastasis and angiogenesis. However, few studies exist on the role of CD147 in tumor immunosuppression, which is the key point of this thesis. In order to understand the role of CD147 in lung cancer, the genetically engineered mouse cell line LLC1 was used to block CD147 and the impact of this blockade on tumor immunosuppression in vivo was evaluated. Inhibition of CD147 led to a decrease in glucose consumption, and less accumulation of extracellular lactate. However, no differences were observed in the growth of spheroids, nor in cell viability. In vivo models, verification that CD147 inhibition led to an increase in cell proliferation of our tumors, endorsement of PCNA labeling by immunohistochemistry, and through a flow cytometry analysis, observation of an increase in PD-L1 expression on macrophages and a significant reduction in CD69 activation in CD8+ T cells. In conclusion, this study suggests that the absence of CD147 promotes tumor immunosuppression, however further studies are needed.

**Keywords:** Lung cancer, CD147, immunosuppression.

## Índice

1.Introdução.....	1
1.1. Epidemiologia e fatores de risco do cancro do pulmão .....	1
1.2. Classificação e estadiamento do cancro do pumão .....	2
1.3. Tratamento do cancro do pulmão .....	3
1.3. CD147 no cancro.....	4
1.4. O lactato do microambiente tumoral, promove imunossupressão.....	8
2. Obetivo.....	11
3. Métodos.....	12
3.1. Linhas celulares.....	12
3.2. Western Blot.....	12
3.3. Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR).....	13
3.4. Viabilidade celular.....	14
3.5. Ensaio de Metabolismo.....	15
3.6. Ensaio de esferoides.....	15
3.7. Modelo de tumor de ratinhos .....	16
3.8. Processamento do tumor .....	16
3.9. Citometria de fluxo .....	16
3.10. Imunohistoquímica .....	18
3.11. Análise estatística.....	18
4. Resultados.....	19
4.1. Expressão do MCT1, MCT4 e CD147 na linha celular de adenocarcinoma do pulmão (LLC1) .....	19
4.2. Influência da CD147 no crescimento celular <i>in vitro</i> .....	20
4.3. Influência da CD147 no metabolismo das células tumorais.....	21
4.4. O efeito do bloqueia da CD147 no crescimento tumoral <i>in vivo</i> e na população imune dos tumores.....	21
5. Discussão.....	25
6.Conclusão.....	29
7. Referências Bibliográficas .....	30

## **Índice de Abreviaturas**

- ARG1** Arginase-1  
**Asn** Asparagina  
**Bcl2** Linfoma de células B 2  
**BSG** Basigina  
**cAMP** AMP Cíclico  
**CCL2** Ligante de quimiocina 2  
**CD80** cluster de diferenciação 80  
**CD86** cluster de diferenciação 86  
**CD163** cluster de diferenciação 163  
**CD204** cluster de diferenciação 204  
**CD206** cluster de diferenciação 206  
**Células NK** Células natural killer  
**CTLA4** Proteína 4 associada a linfócito T citotóxico  
**DNA** Ácido desoxirribonucleico  
**DPOC** Doenças pulmonares obstrutivas crónicas  
**EGFR** Recetor do fator de crescimento epidérmico  
**EMMPRIN** Indutor de metaloproteínase de matriz  
**GRP132** Recetor acoplado à proteína G 132  
**HIF-1 $\alpha$**  Fator Induzível por Hipóxia 1  $\alpha$   
**HIV** Vírus da Imunodeficiência Humana  
**IFN- $\gamma$**  Interferão  $\gamma$   
**IL-1 $\beta$**  Interleucina 1 $\beta$   
**IL-6** Interleucina 6  
**IL-10** Interleucina 10  
**IL-35** Interleucina 35  
**iNOS** Sintase de óxido nítrico induzível  
**MCH-I** Complexo de histocompatibilidade classe 1  
**MCTs** Transportadores de monocarboxilatos  
**MEC** Matriz extracelular  
**MMPs** Metaloproteínases de matriz  
**MMP-9** Metaloproteínase 9 da matriz  
**MT1-MMP** Metaloproteínase de matriz de membrana tipo 1  
**mTORC1** Complexo 1 do alvo de rapamicina de mamíferos  
**PCNA** Antígeno nuclear de célula proliferante

**PD-1** Proteína de morte celular programada 1  
**PD-L1** Ligando de morte programada 1  
**SRB** Sulforodamina B  
**TCSF** Fator estimulador de colagenase derivado de células tumorais  
**TGF- $\beta$**  Fator de crescimento transformador  $\beta$   
**Th2** Células T helper 2  
**Th17** Células T helper 17  
**TME** Microambiente tumoral  
**TNF- $\alpha$**  fator de necrose tumoral  $\alpha$   
**Treg** Células T regulatória  
**VEGF** Fator de crescimento endotelial vascular  
**VEGFR** Recetor do fator de crescimento endotelial vascular

## 1. Introdução

### 1.1. Epidemiologia e fatores de risco do cancro do pulmão

O cancro do pulmão são tumores que surgem nas células do epitélio respiratório, e é o tipo de cancro com maior taxa de mortalidade a nível mundial em 2020, responsável por cerca de 1,8 milhões de mortes (Figura 1A). Os casos de cancro do pulmão têm vindo a aumentar ao longo dos anos, sendo mais comum em países desenvolvidos e em desenvolvimento, e segundo a Organização Mundial de Saúde, estimou-se cerca de 2,2 milhões de novos casos de cancro em todo o mundo em 2020 (Figura 1B). Este tipo de patologia afetou mais os indivíduos do sexo masculino. No entanto, a epidemiologia do cancro do pulmão não apenas depende da localização geográfica, mas também depende de fatores económicos. Pessoas com nível económico baixo, têm menos acesso a métodos de diagnóstico e de tratamento, o que leva a um aumento de número de casos de cancro do pulmão diagnosticado em estadios avançados, aumentando a mortalidade (1).

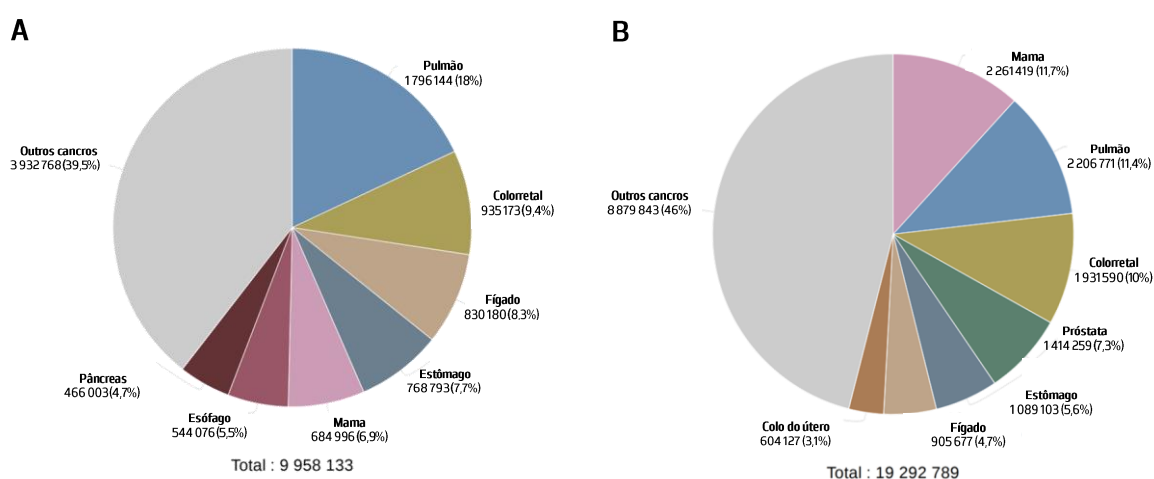


Figura 1 – **A** e **B** Estimativa de mortes e novos casos por cancro do pulmão em 2020 no mundo, respetivamente (1)  
Imagem adaptada de GLOBOCAN.

Devido ao aumento do número de casos de cancro do pulmão, é de extrema importância perceber quais as causas que levam ao desenvolvimento desta doença, de maneira a poder prevenir ou diminuir a exposição de certos fatores cancerígenos.

O tabagismo é o fator de risco mais importante para a ocorrência do cancro do pulmão, que é responsável por cerca de 90% dos casos, onde o risco de um fumante assíduo foi estimado de 10 a 30 vezes maior que um não fumante. O tabagismo está associado a alterações histológicas pré cancerígenas, como a perda de cílios dos brônquios, hiperplasia de células epiteliais brônquicas e anormalidades nucleares, podendo originar carcinoma do pulmão (2). Contudo, a exposição passiva ao fumo do tabaco, também aumenta o risco de desenvolver cancro do pulmão. No entanto, ao longo dos

anos tem-se vindo a descobrir que outros fatores podem estar ligados ao desenvolvimento deste tipo de cancro (3), como as doenças pulmonares obstrutivas crónicas (DPOC), devido a processos de inflamação e cicatrização associados a esta doença. O aumento do stresse oxidativo que leva ao dano do DNA, a longa exposição a citocinas inflamatórias, supressão de mecanismos de reparo de DNA e aumento da proliferação celular, são mecanismos pelos quais a DPOC pode aumentar o risco de cancro do pulmão (4).

As infeções respiratórias, como a tuberculose e o vírus da imunodeficiência humana (HIV), estão também associadas a um elevado risco de cancro do pulmão, devido à inflamação e danos celulares durante a infeção (4).

Para além disso, a exposição ocupacional a certas substâncias carcinogénicas, aumenta o risco deste tipo de cancro, como o amianto, dióxido de enxofre, níquel e crómio (4).

Fatores genéticos também estão associados a um risco aumentado de carcinoma do pulmão. Familiares de pacientes com cancro de pulmão têm um risco de 1,7 vezes aumentado em desenvolver esta doença. No entanto, se o historial positivo for entre parentes de primeiro grau, o risco aumenta para 2 a 4 vezes (1).

A dieta, como o consumo de carnes vermelhas, laticínios e gorduras saturadas, também estão relacionadas com um maior risco em desenvolver cancro do pulmão. Alguns estudos têm vindo a demonstrar efeitos protetores de certos ingredientes. No entanto, estudos recentes vieram a demonstrar o contrário. Como por exemplo, foi mostrado que o betacaroteno e as vitaminas C e E, tinham efeitos protetores contra o cancro do pulmão. Mas outros estudos viram que a suplementação destes ingredientes, não tiveram benefícios associados. Portanto, de maneira geral, a suplementação dietética na prevenção do cancro do pulmão ainda não é clara (1).

Por fim, a predisposição genética também está relacionada como uma potencial causa no desenvolvimento desta doença. Se determinados genes, como EGFR, CHECK2, BRAC2, TP53, PARK2 e p53 sofrerem mutações, o risco de desenvolvimento de cancro do pulmão aumenta significativamente (5).

## **1.2. Classificação e estadiamento do cancro do pumão**

Com base nas características histológicas, o cancro do pulmão é dividido em duas grandes categorias, o cancro do pulmão de pequenas células que representa cerca de 15% de todos os cancros de pulmão, e o cancro do pulmão de não pequenas células, que é o mais comum, representando cerca de 85%. O cancro de pulmão de não pequenas células, divide-se em adenocarcinoma de pulmão, carcinoma de células escamosas de pulmão e por último, o cancro do pulmão de grandes células (4).

O estadiamento do cancro do pulmão é uma etapa importante no planeamento do tratamento a aplicar, na indicação do prognóstico e ajudar na avaliação dos resultados do tratamento, e para tal, recorre-se

ao sistema T.N.M.. A letra T, diz respeito ao tamanho do tumor primário, a letra N, descreve a extensão do envolvimento dos linfócitos, e por último a letra M, inidica a existência de metastases à distância. A adição de números a essas categorias descreve a extensão do cancro. Baseado no estadiamento, o estadio de um paciente com cancro do pulmão de não pequenas células pode ser de I a IV. Ou seja, quanto mais baixo o estadio, melhor o prognóstico do paciente (4).

### **1.3. Tratamento do cancro do pulmão**

O tratamento do cancro do pulmão depende de várias variáveis, como o tipo histológico, o estadio, idade do doente e características moléculares do tumor, e para tal existem algumas opções como cirurgia, quimioterapia e radioterapia (4).

A imunoterapia é uma alternativa de tratamento de tumores, para pacientes que não respondem às terapias convencionais. A imunoterapia tumoral tem como objetivo manipular o sistema imunitário de maneira a aumentar a resposta anti-tumoral. Os principais tipos de imunoterapia utilizada no tratamento contra o cancro do pulmão de não pequenas células são as vacinas e inibidores de checkpoint imunológico. O checkpoint imunológico, diz respeito a vias inibitórias importantes para a autotolerância. No entanto, os tumores usam essas vias para fugir à vigilância imunológica, através da expressão de moléculas inibitórias que ao ligarem ao respetivo recetor presentes nas células T, inibem a sua atividade citotóxica (2).

Os inibidores de checkpoint são, a proteína 4 associada a linfócito-T citotóxico (CTLA4 do inglês *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), proteína de morte celular programada 1 (PD-1 do inglês *programmed Cell Death Protein 1*) e ligando de morte programada 1 (PD-L1 do inglês *programmed death-ligand 1*). A CTLA4 é uma proteína encontrada nas células T, que quando se liga ao seu recetor, CD80 ou CD86 presentes em células apresentadoras de antígeno (6), inibe a sua atividade anti-tumoral. Já o PD-L1, é expresso por tumores, que ao ligar-se ao PD-1, presente nos linfócitos T, inibe a proliferação e atividade deste tipo de células do sistema imune. Portanto como terapia imunológica, são usados inibidores que se ligam ao PD-L1 que impedem a sua ligação ao recetor PD-1, fazendo com que as células T exerçam a sua atividade citotóxica (8). Foi demonstrado, que bloqueio da CTLA-4 com Ipilimumab, e o bloqueio de PD-1 com Nivolumab, aumentaram significativamente as respostas imunes anti-tumorais (4).

Por último, a vacinação contra o cancro, tem como objetivo, aumentar as respostas anti-tumorais das células T e a produção de anticorpos. Alguns exemplos de vacinas como potenciais terapêuticos para o cancro do pulmão de não pequenas células são a vacina MAGE-A3, a vacina lipossomal-BLP25 (13) e a vacina Racotumomabe (3).

Ainda há muito resistência bem como a falta de terapias, logo a necessidade de encontrar novos potenciais alvos terapêuticos.

### 1.3. CD147 no cancro

A CD147 é uma glicoproteína transmembranar Tipo I, que se encontra na superfície de diversas células, como é o caso das células tumorais e estromais, incluindo células epiteliais e fibroblastos. Inicialmente a CD147 foi denominada por fator estimulador de colagenase derivado de células tumorais (TCSF do inglês *tumor cell-derived collagenase-stimulating factor*) mas entretanto foi renomeada e atualmente é designada por indutor de metaloproteinase de matriz (EMMPRIN) com base na sua função indutora de metaloproteinases de matriz (MMPs) (7). Inicialmente o aumento da expressão de MMPs nos tumores, foi associado à função pró-tumoral da CD147, no entanto diversos estudos mostraram que a CD147 está ligada a outros mecanismo devido à sua capacidade de se ligar a outras moléculas (8).

A CD147 é codificada pelo gene *Basigin* (BSG) localizado no cromossoma humano 19. Atualmente existem quatro isoformas distintas, devido ao *splicing* alternativo e às diferenças nos locais de iniciação da transcrição (9).

A Basigina 1, específica da retina apresenta três domínios de imunoglobulina na porção extracelular (10), e as isoformas Basigina 3 e 4, contêm apenas um domínio de imunoglobulina (11). A Basigina 2 é a isoforma mais abundante e mais bem caracterizada, conhecida como CD147 ou EMMPRIN. Esta isoforma é constituída por uma sequência de sinal de 21 aminoácidos, um domínio extracelular de 184 aminoácidos com dois domínios de imunoglobulina, um domínio transmembranar de 24 aminoácidos e um domínio citoplasmático com 39 aminoácidos (Figura 2). A porção extracelular da CD147 é constituída por dois domínios, D1 corresponde ao domínio N-terminal, resíduos 22-101, e D2 corresponde ao domínio C-terminal. A atividade biológica do domínio D1, é dependente dos sítios de glicosilação do domínio D2, que fazem com que domínio D1 fique exposto à superfície da célula para interações com ligantes fisiológicos (12).

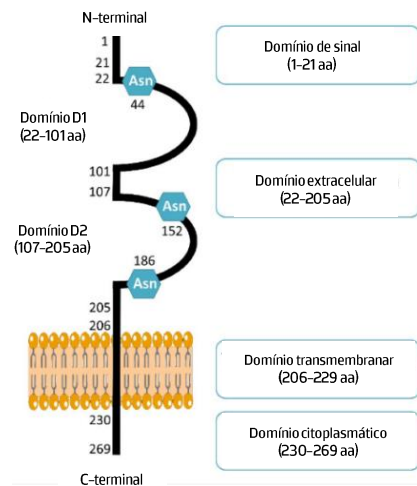


Figura 2 – Estrutura da CD147. Esta proteína é composta por um domínio de sinal, um domínio extracelular, um domínio transmembranar e um domínio citoplasmático. Imagem adaptada de *Landras et al. (7)*.

Para além disso, as quatro isoformas da CD147 são glicosiladas, influenciando na sua atividade. Existem três sítios de glicosilação de asparagina (Asn) na região extracelular, e os níveis de glicosilação da CD147 estão relacionados com os seus diferentes pesos moleculares (13). Por isso, com base no grau de glicosilação a CD147 pode ser classificada como: CD147 altamente glicosilada (HG-CD147) de peso molecular aproximadamente 45–65 KDa, e CD147 pouco glicosilada (LG-CD147), com um peso molecular de aproximadamente de 32 KDa (14).

A CD147 também pode existir na sua forma solúvel. Foram descritos dois mecanismos pelos quais as células obtêm essa forma solúvel da CD147. Um mecanismo consiste na clivagem mediada pela metaloproteinase de matriz de membrana tipo 1 (MT1-MMP), que é uma protease responsável pela quebra de ligação da CD147 à superfície celular (15), e o segundo é baseado na libertação de microvesículas onde se encontra a CD147. Foi demonstrado que a forma solúvel da CD147, foi associada ao crescimento tumoral, formação de metástases e quimiorresistência, e tem sido proposta como um biomarcador clínico em cancro da mama (16) e carcinoma hepatocelular (17).

A CD147 desempenha papéis fundamentais no normal funcionamento do nosso organismo no entanto, a CD147 também tem um importante peso na progressão de diversas doenças, como o cancro (Figura 3) (18).

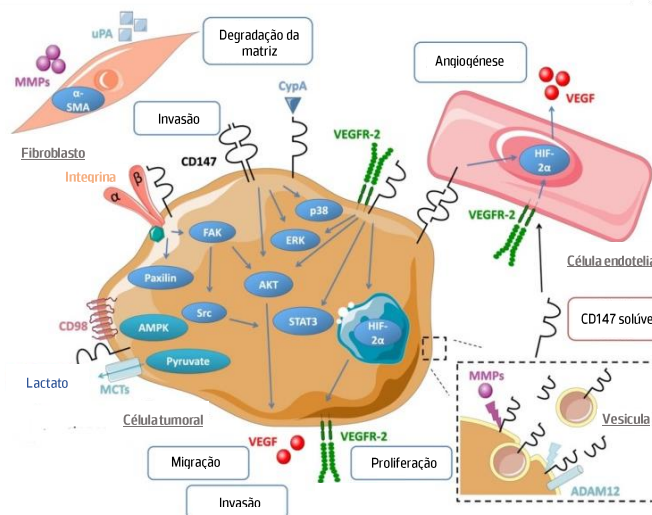


Figura 3 – Papel geral da CD147. Está envolvida em diversos processos no contexto do cancro, tais como: angiogénese, degradação da matriz extracelular, invasão, metastização e proliferação tumoral. Imagem adaptada de Landras et al. (7).

Para que as células tumorais possam invadir tecidos adjacentes e metastizar, é necessário que haja alteração dos mecanismos de adesão celular. Vários estudos mostraram que a CD147 regula a adesão celular através da sua interação com umas proteínas designadas de integrinas. As integrinas são proteínas de adesão presentes na membrana celular, compostas por heterocomplexos de cadeia  $\alpha$  e  $\beta$ . Estas, medeiam interações entre células, estando envolvidas na remodelação da matriz extracelular, e consequentemente facilitam a proliferação e promovem a invasão e metastização das células tumorais (19).

No entanto, a invasão e metastização celular, também depende da remodelação da matriz extracelular (MEC). As enzimas responsáveis pela degradação da membrana celular e da matriz extracelular são as metaloproteínases de matriz. A presença da CD147 presente nas células tumorais, mostrou ter um papel de grande peso na promoção da invasão e metastização celular, pois promove a síntese de diversas MMPs. As MMPs estimuladas pela CD147, que estão mais associadas com a progressão tumoral em alguns tipos de cancro são: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8 e MMP-11 (19,20). No entanto, a MMP-11, para além de ser responsável pela degradação da matriz extracelular, esta proteína confere resistência das células tumorais à apoptose (22). A CD147 mostrou ainda induzir a expressão do sistema ativador do plasminogénio do tipo uroquinase. Ou seja, os ativadores do plasminogénio do tipo uroquinase clivam o plasminogénio a plasmina, que por sua vez tem potencial proteolítico, sendo capaz de degradar a matriz extracelular, promovendo ainda mais a invasão e metastização tumoral (23).

A CD147 também é capaz de regular a produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF do inglês *vascular endothelial growth factor*) em células tumorais e do estroma, através da via PI3K-Akt, e consequentemente promove a angiogénese. A angiogénese auxilia o desenvolvimento do tumor,

pois fornece oxigênio e metabolitos como a glicose. No entanto, a produção do fator de crescimento endotelial vascular, pode estar dependente da regulação da expressão das MMPs (9).

A CD147 está envolvida na quimiorresistência do cancro através da regulação de determinadas proteínas como o transportador ABCG2. Este é um tipo de transportador, presente em células tumorais, que medeia a multirresistência a diversos fármacos (24). A CD147 interage com este transportador, e pode aumentar a sua expressão, e afetar a sua localização e dimerização celular da proteína, fazendo com que o fármaco seja expulso da células tumoral (25).

A CD147 pode estar também ligada à imunossupressão tumoral, apesar de existirem poucos estudos relativamente a este tema. *Li, X et al.* mostraram que a CD147 promoveu um ambiente imunossupressor através do aumento do metabolismo da glicólise (26). Um outro estudo, demonstrou que o bloqueio da CD147, levou à diminuição da expressão dos transportadores de monocarboxilato (MCTs) e conseqüentemente à diminuição do lactato no meio extracelular. Isto fez com que houvesse uma menor infiltração de macrófagos do tipo pró-tumorais, no microambiente tumoral (TME).

Por último, a CD147 está também associada ao metabolismo das células cancerígenas. As células tumorais, captam grandes quantidades de glicose para manter os níveis de ATP, de maneira a poderem proliferar. Da metabolização da glicose pode originar piruvato que entra nas mitocôndrias, no ciclo de Krebs. No entanto, na maioria das células tumorais, mesmo na presença de oxigênio, a glicose acaba por ser convertida em lactato, tal evento é conhecido como glicólise aeróbica ou Efeito de Warburg. O Efeito de Warburg, descrito em 1924 por Otto Warburg, foi proposto como um mecanismo de adaptação metabólica para suportar as altas demandas de energia resultantes da proliferação descontrolada (27). Conseqüentemente, há produção excessiva de ácido láctico que necessita de ser transportado para o microambiente tumoral, mantendo a homeostasia do pH intracelular das células tumorais, e para tal as células tumorais usam os transportadores de monocarboxilato. Estes transportadores catalisam o co-transporte de um próton acoplado a um monocarboxilato, incluindo o lactato e o piruvato. Este transporte é bidirecional dependente do gradiente de prótons e da concentração de lactato. Existem 14 membros de transportadores de monocarboxilato, mas apenas 4 isoformas (MCT1-MCT4), transportam monocarboxilatos (lactato) associada a um próton. No entanto, o MCT1, MCT3 e MCT4 para exercerem a sua função e para se manterem na membrana plasmática, estes transportadores precisam da CD147 como chaperona. Já o MCT2 tem como chaperonas a embigina e neuroplastina, e nos espermatozoides a CD147. Contudo, quando a CD147 está ausente, a embigina pode ligar-se ao MCT1, e desta forma o transportador torna-se funcional (28). Posto isto, duas isoformas de MCTs, o MCT1 e MCT4, estão principalmente envolvidos no transporte de lactato e estão superexpressos em diversos tipos de cancros. Existem estudos que sugerem que em alguns tipos de tumorais, o MCT1 atua na captação de lactato nas células tumorais e nas células endoteliais, enquanto o MCT4 atua no efluxo de lactato para o microambiente tumoral (29).

#### 1.4. O lactato do microambiente tumoral promove imunossupressão

Tal como as células tumorais, o microambiente tumoral é um sistema muito complexo e dinâmico. Este é constituído por diversos tipos de componentes, como fibroblastos associados ao tumor, células endoteliais, matriz extracelular, células do sistema imunitário e células tumorais. Ainda é constituído por fatores de crescimento e metabólitos celulares e nutrientes. Dentro destes metabólitos, o lactato é um importante imunossupressor, influenciando a função de várias células do sistema imunitário, como por exemplo, os macrófagos e os linfócitos T (30).

Os macrófagos são as células do sistema imune mais abundantes no microambiente tumoral, que derivam de monócitos que se encontram em circulação, que por sua vez migram para tecidos inflamados onde se diferenciam em macrófagos, e podem ter dois fenótipos. O fenótipo do tipo M1, têm a capacidade de promover a inflamação e fagocitam células tumorais, sendo então considerados pró-inflamatório/anti-tumorais. Já o fenótipo do tipo M2 que são considerados pró-tumorais, suprimem a inflamação, promovem a reconstrução da matriz extracelular e cicatrização de feridas, e secretam fatores de crescimento facilitando a progressão tumoral (31).

Os macrófagos do tipo M1, aumentam marcadores de superfície e proteínas de referência, característicos deste fenótipo, como CD80, CD86, interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e síntese de óxido nítrico induzível (iNOS) (32). Pelo contrário, os macrófagos do tipo M2, expressam altamente CD163, CD206, CD204, IL-10, fator de crescimento transformador (TGF)- $\beta$  e arginase-1 (ARG1) (33). Para além disso, os macrófagos têm a capacidade de polarizar entre os dois fenótipos, podendo apresentar ambos os marcadores de fenótipos, e por isso é difícil distinguir a polarização M1 e M2 por marcadores de superfícies. Portanto, foi demonstrado, que a ARG1 e o iNOS são enzimas que permitem distinguir as diferenças entre os dois perfis dos macrófagos, sendo atualmente considerados marcadores confiáveis de polarização de macrófagos derivado de ratinhos (31).

Posto isto, o lactato desempenha um papel central na função dos macrófagos associados ao tumor. Este pode inibir a função dos macrófagos M1, através da redução da expressão de IL-6, iNOS e do ligante de quimiocina 2 (CCL2) (34). Para além disso, o lactato promove a polarização de macrófagos pró-tumorais devido à estabilização do fator induzível por hipóxia 1-alfa (HIF-1 $\alpha$  do inglês *hypoxia-inducible factor 1-alpha*) e ativação da via de sinalização ERK-STAT3 (35). Além disso, o lactato aumenta a expressão de PD-L1 e conseqüentemente eleva a expressão de HIF-1 $\alpha$  em macrófagos, que por sua vez promove a apoptose de células T (36). O lactato leva ainda ao aumento da expressão de CD163, um marcador de macrófagos M2 (31). Foi ainda mostrado que o lactato promove a polarização dos macrófagos no fenótipo pró-tumoral pela sua interação com o recetor GPR132. Ou seja, o lactato liga-se ao GPR132, que é expresso em elevados níveis na superfície dos macrófagos, e

induz o AMP cíclico (cAMP), aumentando assim a expressão da ARG 1, VEGF e HIF-1 $\alpha$ , e desta forma leva à polarização dos macrófagos M2 (36). *Zhang D. et al.*, mostraram que o lactato intracelular pode levar a modificações a nível epigenético. Eles observaram que este metabolito, leva à lactilação de resíduos de histona em macrófagos, que promovem a produção de fatores oncogénicos por macrófagos do tipo M2 (37).

A atividade dos linfócitos T, também é inibida pelo lactato. A população deste tipo de células do sistema imunitário no TME é bastante heterogénea influenciando a tumorigénese, e inclui as células T citotóxicas (células T CD8), células T helper (células T CD4) e reguladoras (Treg – (células T CD4Foxp3)). As células T citotóxicas reconhecem os antígenos tumorais e liberam grânulos que contêm perforina que lisa a membrana das células tumorais, e granzima, que causa apoptose das células tumorais. Para além disso, a apoptose também pode ser iniciada pela ligação do recetor de morte, ou seja, os ligandos Fas e TRAIL quando se ligam aos seus respetivos recetores presentes nas células tumorais, promovendo a ativação de uma cascata de caspases, levando à apoptose das células tumorais (38). No entanto, as células tumorais para escapar aos mecanismos de apoptose, podem regular negativamente o MCHI, que é uma molécula essencial para que as células T citotóxicas interagem com as células tumorais (39). Além disso, as células tumorais regulam moléculas anti-apoptóticas como BCL2 e podem ter uma expressão alterada de recetores de morte, e desta forma conseguem escapar aos mecanismos de morte celular programada das células T citotóxicas. Além de terem a capacidade de matar as células tumorais, as células T citotóxicas, inibem a angiogénese através da secreção de interferão gama (IFN- $\gamma$ ) (38). É de destacar, que a ativação das células T é sustentada pela presença de células T helper, como a Th1, através da produção de citocinas tais como a IL-2, e IFN- $\gamma$ . O IFN- $\gamma$  também pode suprimir o crescimento tumoral, uma vez que estimula a regulação positiva de MHC I (40). No entanto, no microambiente ácido, devido à movimentação de lactato, a diferenciação das células T são direcionadas para se polarizar em células Th2, Th17 ou Treg. Isto é, as células Th2 e Th17 são capazes de promover a angiogénese e inibem a atividade das células Th1. Já as células Treg, são células com atividade imunossupressora, que inibem diversas células do sistema imune (38). Além disso, o microambiente ácido também afeta o metabolismo das células T. As células T quando são ativas, para proliferarem e para poderem exercer as suas funções, aumentam a captação de glicose. No entanto, no TME, a disponibilidade da glicose é limitada devido à glicólise elevada das próprias células tumorais, havendo desta forma uma grande competição entre as células por este nutriente. Posto isto, sem glicose, as células T não podem sobreviver nem expandir uma vez ativadas (41). Para além disso, o lactato libertado pelas células tumorais, regula negativamente o metabolismo das células e inibe a exportação de lactato das células T. E desta forma, o lactato acumulado, dificulta a atividade das células T efetoras (41). O lactato, inibe a atividade citotóxica das células T, através do bloqueio do fator de transcrição de células T, reduzindo desta forma a produção de IL-2, IFN- $\gamma$ , perforina, granzima, e

aumenta a anergia e apoptose. Um microambiente ácido também contém níveis elevados de ARG1, que degrada a arginina, e conseqüentemente, suprime a atividade das células T. Isto porque, arginina é essencial para a função das células T, e também é necessária para a expressão da cadeia  $\zeta$  do recetor das células T. Ao eliminar esta cadeia do recetor, há o bloqueio da ativação da proliferação, glicólise e produção de citocinas por parte das células T (42). O lactato, reduz ainda a mobilidade das células T citotóxicas (43).

O lactato está ainda envolvido na expressão da molécula co-inibitória PD-L1, que está presente nas células tumorais. O PD-L1 ao ligar-se ao PD1 presente nos linfócitos T, e uma vez que, os sinais inibitórios são maiores que os estimulatórios, as células T não serão ativas. *H. Chi* demonstrou que o lactato pode interferir na sinalização do complexo 1 do alvo de rapamicina de mamíferos (mTORC1), que coordena eventos importantes como, sinalização do receptor imunológico, regulação metabólica, atividade migratória, e promoção da diferenciação de células efetoras TH1 e TH2, enquanto suprime a indução de células Treg e a anergia das células T (44).

Finalmente, o microambiente ácido favorece o desenvolvimento e atividade das células Treg. Este tipo de células, são normalmente importantes para suprimir respostas inflamatórias, controlam a autoimunidade, inibem danos nos tecidos, controlam a inflamação, mas no contexto tumoral, as células Treg, promovem o desenvolvimento e a progressão tumoral ao neutralizar as respostas imunes anti-tumorais. Esta função supressora é devido à sua capacidade de libertar citocinas imunossupressoras tais como, TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-35 (45). As células Treg removem o complexo de histocompatibilidade tipo II, debilitando a capacidade das células dendríticas de apresentarem antígenos tumorais às células T.

Ao contrário das células T, as células Treg, desenvolvem-se em ambientes pobres em glicose. Estas em vez de usarem a glicose como combustível, metabolizam o lactato que se encontra em grandes quantidades no microambiente tumoral, para se proliferarem. Tal evento é devido ao aumento da expressão de MCT1 e FOXP3. Ou seja, O MCT1 permite a entrada do lactato na célula, que é convertido em piruvato, que por sua vez é usado na fosforilação oxidativa. O FOXP3 reprograma o metabolismo, inibindo a glicólise e aumentando a OXPHOS, fazendo com que as células Treg adquiram habilidade para prosperarem no microambiente ácido e pobre em glicose (46,47). Além disso, as células Treg contribuem para um ambiente imunossupressor, pois libertam TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-35, o que resulta na supressão da atividade das células dendríticas, células B, células Natural Killer e células T. As células Treg, têm ainda a capacidade de produzirem granzima B e perforina, permitindo que estas matem células T citotóxicas e células NK (48).

## **2. Obetivo**

A CD147 é uma glicoproteína transmembranar que está envolvida tanto em processos fisiológicos como patológicos. Esta proteína está amplamente expressa em diversos tecidos, no entanto a sua expressão é elevada em vários tipos de cancro, incluído o cancro do pulmão de não pequenas células. Na literatura, existem variados estudos sobre o papel da CD147 no cancro, sabe-se que está envolvida no metabolismo tumoral, e é capaz de promover a invasão, metastização tumoral, bem como a angiogénese. No entanto, o papel da CD147 na immunossupressão tumoral é ainda pouco explorado. Assim, o objetivo desta tese, é estudar o papel da CD147 na imunosupressão tumoral em cancro do pulmão.

### 3. Métodos

#### 3.1. Linhas celulares

A linha celular de adenocarcinoma do pulmão, LLC1 (Lewis lung carcinoma line 1) foi fornecida pelo Doutor Massimilino Mazzone da Universidade de Leuven na Bélgica. A linha celular LLC1 foi previamente geneticamente modificada para a inibição da CD147 pela técnica de CRISPR-cas9 (KOCD147). As células LLC1 *WildType* (WT) foram usadas como controlo. Durante os ensaios as células LLC1WT e KOCD147 foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM, com 4,5 g/L de D-Glucose, L-Glutamina, piruvato de sódio e 3,7 g/L NaHCO<sub>3</sub> – PAN BIOTECH) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS, SIGMA ALDRICH) e 1% de Penicilina Estreptomicina, e mantidas numa incubadora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.2. Western Blot

As células LLC1WT e KOCD147 foram cultivadas até 80% de confluência, e a proteína total foi obtida com 80 µL de tampão de lise (50 mM Tris pH 7,6–8,0; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 10 mM NaF; 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; 1% NP-40) suplementado com inibidor de proteases (Roche®), por 15 minutos, e depois centrifugadas a 14.800 rpm durante 10 minutos a 4°C. De seguida, os sobrenadantes foram recolhidos, e a proteína foi quantificada pelo método de Bradford. As concentrações de proteína foram calculadas usando padrões de albumina de soro bovino. Resumidamente, 2 µL de cada padrão ou amostra, 98 µL de PBS e 200 µL de Reagente de Bradford (Bradford Reagent, SIGMA), foram colocados em cada poço, de uma placa de 96 poços. Finalmente, a absorvância foi medida, num leitor de microplacas a 590 nm. Os lisados proteicos foram armazenados a -80°C. Seguidamente, 30 µg de proteína foi adicionado 1/3 do tampão de carregamento *Laemmli 4X* (Bio-Rad) e desnaturados no Thermoblock por 5 minutos a 98°C. As proteínas foram separadas no gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10%, transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Biosciences) em tampão Tris-base 1X/glicina, por 30 minutos, através do sistema de transferência Trans-Blot Turbo (Bio-Rad). As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em TBS/0,1% Tween (TBS-T; pH=7,4) por 1 hora à temperatura ambiente. Após incubação durante a noite com anticorpos primários (Tabela 1) a 4°C, as membranas foram lavadas com TBS/0,1% Tween 20, e incubadas com anticorpos secundários marcados com peroxidase de rábano (HRP) (Tabela 2), por uma hora à temperatura ambiente. A tubulina foi usada como proteína padrão. Os anticorpos ligados foram visualizados por quimioluminescência (kit Clarity Western ECL substrate, EUA), e a quantificação da proteína foi realizada com o software ImageJ.

Tabela 1 – Anticorpos primários usados no Western Blot.

Proteína	Referência	Diluição
CD147	Mouse SC-71038 (Santa Cruz Biotechnology®)	1/500
MCT1	Mouse SC-365501 (Santa Cruz Biotechnology®)	1/500
MCT4	Mouse SC-376465 (Santa Cruz Biotechnology®)	1/300
$\beta$ -Tubulina	Mouse BL605102 (BioLegend®)	1/1000

Tabela 2 – Anticorpo secundário usado no Western Blot.

Proteína	Referência	Diluição
Anti-Mouse IgG-HRP	SC-516102 (Santa Cruz Biotechnology®)	1/5000

### 3.3. Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR)

O RNA total da linha LLC1WT e KOCD147, foi obtido por adição de 500  $\mu$ L do reagente Trizol (Ambion, Carlsbad, CA, USA) e de seguida incubadas com 100  $\mu$ L de clorofórmio de forma obter três fases (fase aquosa, orgânica e fase branca). Depois de incubar 3 minutos à temperatura ambiente, e centrifugar a 12.000g durante 5 minutos, foi recolhida a fase aquosa para um novo Eppendorf livre de RNase, e foi adicionada 500  $\mu$ L de isopropanol para precipitar o RNA. Após incubação de 10 minutos, adicionou-se 1 mL de etanol 75% para remover o resto de isopropanol e de outros contaminantes, sendo posteriormente centrifugado a 7.500g durante 5 minutos a 4°C. Esta etapa foi realizada duas vezes de maneira a lavar bem os pellets. Por fim, o sobrenadante foi descartado e os pellets foram eluídos com 12  $\mu$ L de água ultrapura (Invitrogen). As concentrações de RNA e o seu grau de pureza foram determinados usando um espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 através das razões A260/280 e A260/230.

Para a síntese do DNA complementar foi usado o *kit xpert cDNA Syntesis SuperMix*. Ou seja, colocou-se 1  $\mu$ g de RNA total extraído das células em tubos de PCR, e foi adicionado 4  $\mu$ L *Xpert cDNA Synthesis Supermix (5X)* e água livre de RNases até prefazer o volume de 20  $\mu$ L. Depois as amostras foram incubadas, no termociclador, durante 15 minutos a 37°C seguido de 10 minutos a 60°C.

Após respetiva diluição, para garantir uma amplificação máxima, foi usado o kit Xpert Fast Syber Mastermix. Para tal, primeiro foi feita uma mix de reação para cada gene que continha 5 µL de *Xpert Fast Syber Mastermix* com ROX, 2,4 µL de água livre de RNase e 0,3 µL de cada primer reverse e forward, para CD147, MCT1, MCT4 e HPRT (Tabela 3). De seguida, foi adicionada 1 µL de cDNA numa placa de PCR e 8 µL da mix da reação feita previamente. Por fim, as amostras foram incubadas no termociclador no seguinte programa: 95°C por 3 minutos, 95°C durante 10 segundos por 40 ciclos, temperatura de melting (Tabela 4) durante 10 segundos por 40 ciclos, 72°C durante 10 segundos e por fim, 95°C durante 0,05 segundos. O gene HPRT foi usado como gene referência, para normalizar os resultados obtidos dos genes alvo.

Tabela 3 – Sequência dos primers utilizados no RT-PCR.

Gene	Sequência dos primers	
<i>CD147</i>	Forward	5' GAGAGGTGGCAAGGTACTGC 3'
	Reverse	5' TCTTTCCGACCTTGATCCTG 3'
<i>MCT1</i>	Forward	5' TTCCTCAGCCCTCTTTCAGA 3'
	Reverse	5' GGTTACAGCGGACACTGGAT 3'
<i>MCT4</i>	Forward	5' GCCACCTCAACGCCTGCTA 3'
	Reverse	5' TGTCGGGTACACCCATATCCTTA 3'
<i>HPRT</i>	Forward	5' TGAGGATTTGGAAAGGGTGT 3'
	Reverse	5' GAGCACACAGAGGGCTACAA 3'

Tabela 4 – Temperatura de melting dos respetivos genes utilizados no RT-PCR.

Gene	Temperatura de melting (°C)
<i>CD147</i>	67
<i>MCT1</i>	58
<i>MCT4</i>	64
<i>HPRT</i>	55

### 3.4. Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada, pelo ensaio de sulforodamina B (SRB) (SRB, Sigma-Aldrich), que é um método de quantificação colorimétrica da proteína celular, também designada de biomassa total. Foram plaqueadas  $6 \times 10^3$  células por poço, em triplicado em placas de 48 poços e após 24 horas e 48

horas, as células foram fixadas com 100 µL ácido tricloroacético 10% a 4°C durante 1 hora. Depois, as células foram lavadas com água destilada 4 vezes e deixadas a secar. A seguir, as células foram incubadas com SRB durante 30 minutos, e lavadas com ácido acético 1% para remover a SRB que não se ligou às proteínas. Por fim, para dissolver o corante ligado à proteína, adicionou-se Tris-Base 10 mM, e a absorvância foi medida num leitor e placas (Thermo Scientific Varioskan® Flash), a 540 nm. Os resultados foram normalizados para o tempo 0.

### **3.5. Ensaio de Metabolismo**

As células foram cultivadas em placas de 48 poços numa densidade de  $6 \times 10^3$  células por poço, e deixadas a aderir durante dois dias. Após 72h os sobrenadantes destas células foram recolhidos, e a glicose e o lactato, foram quantificados por meio de kits comerciais (Kit glucose GOD-POD, Kit Lactato LO-POD, respetivamente). Para tal, foi colocado 2 µL de padrão ou de sobrenadante por poço, e de seguida adicionou-se 100 µL do respetivo reagente. Depois de incubar durante 10 minutos para o ensaio do lactato, e 20 minutos para o ensaio da glucose, as absorvâncias foram medidas a 490 nm e 505 nm, respetivamente, das amostras a dos padrões, no leitor de placas Thermo Scientific Varioskan® Flash. Para além disso, a proteína total, expressa em biomassa total, foi avaliada usando o ensaio de SRB. Os resultados foram expressos como µg total/biomassa total, de uma experiência.

### **3.6. Ensaio de esferoides**

Para a formação de estruturas 3D, designadas de esferoides,  $5 \times 10^3$  células (LLC1WT e KOCD147) por poço, foram plaqueadas numa placa de 96 poços "fundo U" coberta com 1% de agarose/PBS. Posto isto, foi necessário centrifugar a placa a 1000 rpm durante 2 minutos, e incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 7 dias. Depois da formação dos esferoides, ao 3º dia, foi adicionado 50 µL de meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, com 4,5 g/L de D-Glucose, L-Glutamina, piruvato de sódio e 3,7 g/L NaHCO<sub>3</sub> – PAN BIOTECH) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS, SIGMA ALDRICH) e 1% de Penicilina Estreptomomicina, a cada 48 horas, e o seu crescimento foi acompanhado ao longo de 7 dias através de fotos, tiradas de dois em dois dias. A área dos esferoides foi calculada através do software Image J.

### 3.7. Modelo de tumor de ratinhos

A indução tumoral foi realizada por injeção subcutânea de  $1 \times 10^6$  células LLC1WT e KOCD147 no flanco direito de ratinhos C57BL6 machos, de 9-12 semanas. O crescimento do tumor foi acompanhado semanalmente usando um *calliper*, recorrendo à seguinte fórmula:  $V = (L \times W^2)/2$  (L = comprimento, W = largura, V= volume). No final da experiência, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os tumores removidos, pesados e processados de acordo com as experiências a realizar. Os experimentos com animais foram realizados de acordo com as Diretrizes Europeias para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, Diretiva 2010/63/UE e o Regulamento Nacional publicado em 2013 (Diário da República, 1.a série–No 151–7 de agosto de 2013). Desta forma, os tumores da primeira experiência foram usados para análise de expressão de proteínas por imunohistoquímica e para tal, estes foram fixados em formaldeído 10% e incluídos em parafina. Os tumores da segunda experiência foram utilizados para análise da população do sistema imunitário no tumor.

### 3.8. Processamento do tumor

O primeiro passo foi a digestão do tumor, que consistiu em cortar o tumor em pedaços pequenos com o auxílio do tampão de digestão (RPMI (PAN BIOTECH), Pen/Strep 1%, Soro Fetal Bovino (FBS, SIGMA ALDRICH), dispase (Gibco) e colagenase D (Gibco)). Depois de incubar a 37°C durante 30 minutos as células foram filtradas num filtro de 50  $\mu$ m, com FACS buffer (2% de PBS, 2mM EDTA), ressuspendidas com o tampão de lise de glóbulos vermelhos (150 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0.1 mM EDTA; 10 mM  $\text{KHCO}_3$ ; pH=7.4) e centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos. Depois de remover todos os glóbulos vermelhos, as células foram lavadas com FACS buffer, seguida de uma centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos. A seguir, as células foram ressuspendidas com 3 mL de FACS buffer e filtradas num filtro de 40  $\mu$ m. Posto isto, foi necessário contar as células com Trypan Blue, e de seguida foram diluídas.

### 3.9. Citometria de fluxo

Para análise da população de macrófagos e linfócitos T, 2 milhões de células foram ressuspendidas em PBS e incubadas com o reagente de bloqueio do recetor Fc por 15 minutos a 4°C, seguido pela adição da respetiva mix de anticorpos (Tabela 5) durante 30 minutos a 4°C, protegido da luz. De seguida, foi feita uma lavagem com 150  $\mu$ L de PBS seguida de uma centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos. Depois de tirar o sobrenadante, 100  $\mu$ L de um marcador de viabilidade foram adicionadas às células e deixadas a incubar por 30 minutos a 4°C. Depois de mais uma lavagem e centrifugação, as células foram fixadas com PFA 4% durante 30 minutos, lavadas e ressuspendidas em 300  $\mu$ L de FACS buffer. Posto isto, as células marcadas com a mistura de anticorpos para os linfócitos T, foram

permeabilizadas com uma solução de Triton 1% em PBS durante 15 minutos, lavadas e incubadas durante a noite, a 4°C com o marcador FOXP3. No dia seguinte, as células marcadas, foram lavadas, centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, e ressuspensas em 300 µL de FACS buffer. Finalmente, as células foram analisadas por citometria de fluxo, e os dados tratados pelo software FlowJo10.

Tabela 5- Anticorpos usados na citometria de fluxo.

<b>Anticorpo</b>	<b>Referência</b>	<b>Diluição</b>
<i>Recetor Fc</i>	Purified rat anti-mouse CD16/CD32 (mouse BD Fc block), 553142, BD Pharmingen™, BD Biosciences	2 uL em 50 ul de tampão Fc block por amostra
<i>F4/80</i>	PercP/CY5.5 anti-mouse F4/80, 123128 Biologend®	1/200
<i>CD68</i>	PE/Cyanine7 anti-mouse CD86, 105013 Biologend®	1/400
<i>MHCII</i>	Brilliant Violet 711™ anti-mouse I-A/I-E antibody, 107643, Biologend®	1/200
<i>CD45</i>	APC-Cyanine7 anti-mouse CD45, 103116 Biologend®	1/500
<i>PDL1</i>	APC anti-mouse CD274 (B7-H1, PD-L1), 124311, Biologend®	1/100
<i>CD11b</i>	Anti-mouse CD11b, eBioscience™, eFluor <sup>R</sup> 450, 48-0112-82, Invitrogen™	1/500
<i>CD206</i>	Brilliant Violet 785™ anti-mouse CD206 (MMR), 141729, Biologend®	1/100
<i>CD204</i>	PE anti-mouse CD204, 154709, Biologend®	1/100
<i>CD4</i>	PercP/ CY5.5 anti-mouse CD4, 100434 Biologend®	1/300
<i>CD25</i>	PE/ Cyanine7 anti-mouse CD25, eBioscience™, 25-0251-82	1/100
<i>PD1</i>	PE anti-mouse PD1, 135206, Biologend®	1/100
<i>CD147</i>	FITC/ALEXA488, anti-mouse CD147, 123718, Biologend®	1/100

<i>CD8a</i>	Brilliant Violet 785™ anti-mouse CD8a, 301046, Biologend®	1/200
<i>CD69</i>	Brilliant Violet 605™ anti-mouse CD69, 104530, Biologend®	1/200
<i>FOXP3</i>	APC/Alexa647, anti-mouse FOXP3, 320014, Biologend®	1/100
<i>Viability dye</i>	Fixable Viability Dye eFluor™ 520, eBioscience™, 65-0867-14, Invitrogen™	1/1000

### 3.10. Imunohistoquímica

A expressão de PCNA, foi avaliada por imunohistoquímica através do método da estreptavidina-biotina-peroxidase. Resumidamente, após desparafinação e hidratação dos tecidos, estes foram submetidos à recuperação do antigénio, foi realizado por imersão das lâminas numa solução tampão de citrato 10 mM a pH 6,0 e micro-ondas (600 W) por 15 minutos. Após inativação das peroxidases endógenas, com peróxido de hidrogénio 3% por 10 minutos, os tecidos foram lavados em PBS, duas vezes durante 5 minutos. Os tecidos foram então incubados com o anticorpo primário (mouse 307902, BioLegend), com diluição 1/200) durante a noite à temperatura ambiente. Posteriormente, estes foram lavados e tratados com um anticorpo secundário biotilado (mouse 405303, BioLegend com diluição 1/200), por 1 hora. Depois, os tecidos foram incubados com o reagente Saview plus HRP e a reações foram visualizadas com 3,3'-diaminobenzidina (ENZ-ACC105-0200) por 30 minutos. O passo seguinte, consistiu no contraste com hematoxilina de Harris 25%, seguida por uma desidratação numa concentração crescente de etanol e diafanização em xilol. Por fim, as lâminas foram montadas com entellan. A marcação da proteína foi quantificada por ImageJ.

### 3.11. Análise estatística

Neste trabalho, foram usados testes paramétricos para verificar a significância estatística, como o teste *T Student*. Os valores de *p* foram considerados estatisticamente significativos quando inferiores a 0,05 para comparações entre dois grupos. Os gráficos e a análise estatística foram realizados usando o software GraphPad Prism 8.

## 4. Resultados

### 4.1. Expressão do MCT1, MCT4 e CD147 na linha celular de adenocarcinoma do pulmão (LLC1).

Para poder atingir o objetivo desta tese, foi usada a linha celular LLC1 que tinha a proteína CD147 bloqueada pela técnica CRISP-Cas9. Posto isto, o primeiro passo consistiu em verificar a inibição de expressão da CD147 por RT-qPCR e Western Blot. Apesar do bloqueio da CD147 não tenha sido total, verificou-se tanto por RT-qPCR como por Western Blot (Figura 1A, B e C) que houve uma diminuição da expressão da CD147 nas células LLC1KOCD147 quando comparado com o WT ( $p = 0,0421$ ), no entanto no RT-qPCR esta diferença não foi estatisticamente significativa. Uma vez que a CD147 é uma chaperona dos MCTs, analisou-se os níveis de expressão dos transportadores de monocarboxilato do tipo 1 e 4 por RT-qPCR e Western Blot. Verificou-se uma diminuição na expressão do MCT1 e MCT4 ao nível do mRNA (Figura 1C), quando se inibiu a CD147. Já os níveis de proteína de MCT1 e MCT4 foram iguais entre a linha LLC1WT e LLC1KOCD147 (Figura 1A e B).

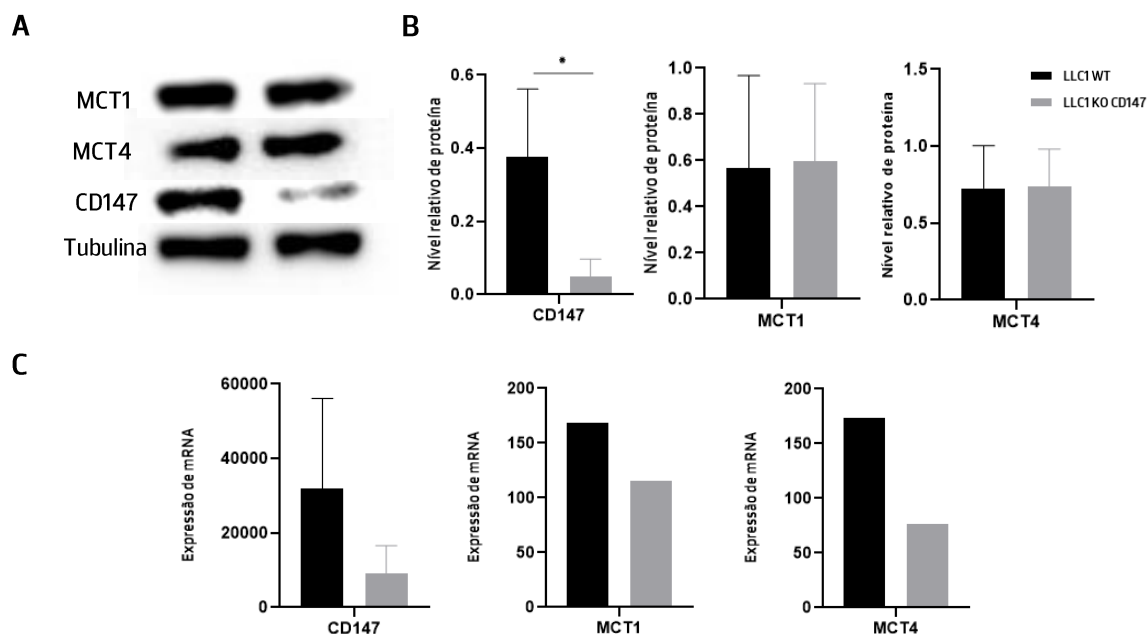


Figura 1 – Níveis de expressão da CD147, MCT1 e MCT4 na linha celular LLC1. O bloqueio da CD147 foi confirmada pelos níveis de proteína e mRNA, usando o Western Blot e RT-qPCR, respetivamente. **A** Análise de Western Blot da proteína CD147, MCT1 e MCT4 na linha LLC1 de três experiências independentes. **B** Níveis relativos de proteína da CD147, MCT1 e MCT4 na linha LLC1. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão; \* $p < 0,05$  pelo teste T Student. **C** Expressão de mRNA da CD147, de duas experiências independentes, MCT1 e MCT4 por RT-qPCR da linha celular LLC1.

## 4.2. Influência da CD147 no crescimento celular *in vitro*.

O segundo passo, consistiu em perceber se o bloqueio da CD147 influencia a viabilidade celular e por isso realizou-se o ensaio de Sulforrodamina B, e se este bloqueio altera o crescimento das células LLC1 em estruturas 3D. Através da análise do ensaio de SRB verificou-se que até às 20 horas de ensaio não houve diferenças na viabilidade celular entre as células LLC1KOCD147 e as WT. No entanto, observou-se que a partir das 20 horas houve uma tendência para uma inibição da viabilidade celular das células LLC1KOCD147 quando comparadas com as células WT. (Figura 2A). Relativamente aos esferoides, que melhor reproduzem um modelo de tumoral, durante 7 dias não foram observadas diferenças no crescimento dos esferoides entre a linha LLC1WT e LLC1KOCD147 (Figura 2B).

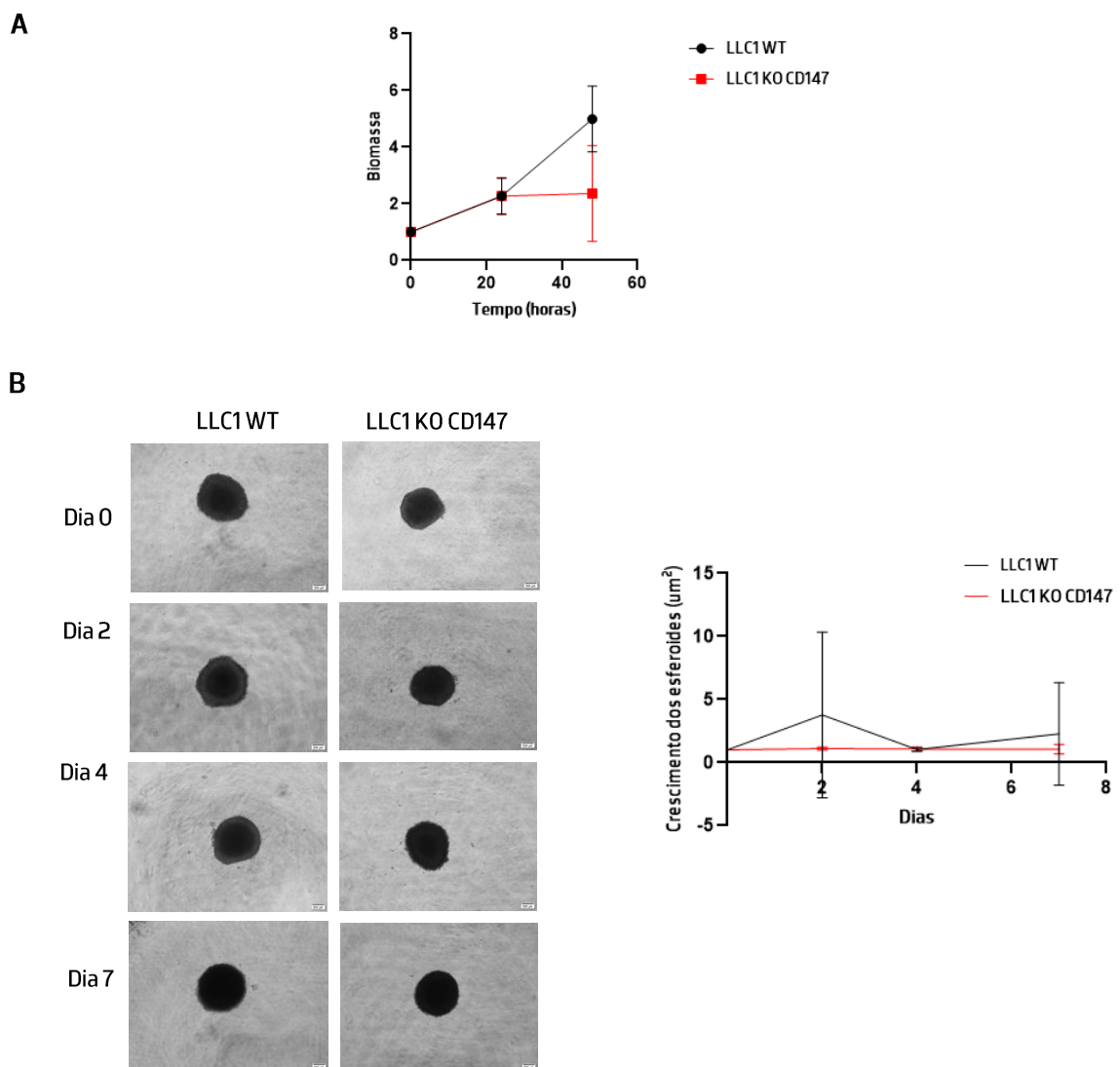


Figura 2 – Crescimento celular da linha LLC1. **A** Viabilidade celular da linha LLC1, usando SRB de três experiências independentes com triplicados. **B** Está representado o crescimento dos esferoides, que foi acompanhado por 7 dias, de duas experiências independentes. Barra de escala, 200  $\mu\text{m}$ .

### 4.3. Influência da CD147 no metabolismo das células tumorais.

Devido ao seu papel como chaperona dos MCTs, analisou-se se a inibição da CD147 interferia com o transporte de lactato e conseqüentemente com o metabolismo das células tumorais. Para tal, recorreu-se a kits enzimáticos comerciais, para avaliar a concentração de glicose e do lactato extracelular, dos sobrenadantes das células em cultura. A inibição da CD147 levou a uma ligeira diminuição no consumo da glicose quando comparado com as células LLC1WT no entanto estas diferenças não foram estatisticamente significativas (Figura 3A). Relativamente ao lactato verificou-se uma diminuição significativa na concentração de lactato extracelular na linha LLC1KOCD147 em comparação à linha celular LLC1 WT ( $p=0,0480$ ) (Figura 3B).

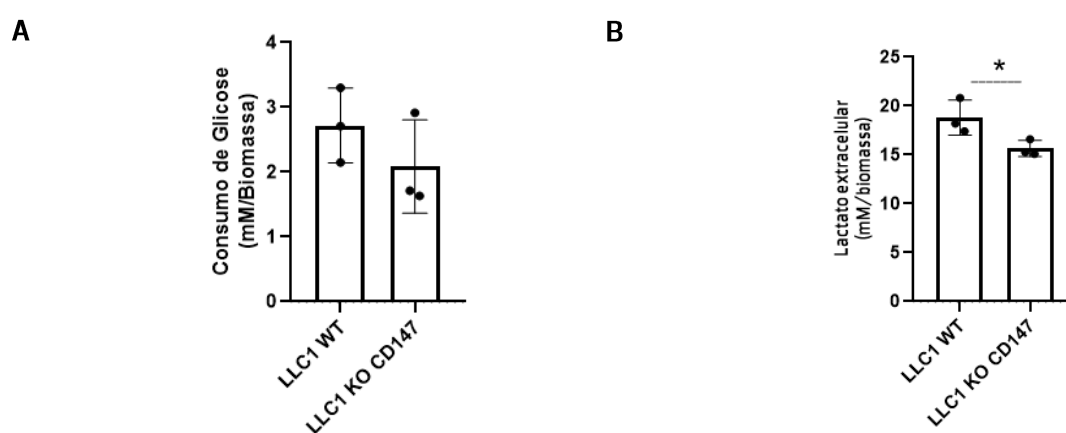


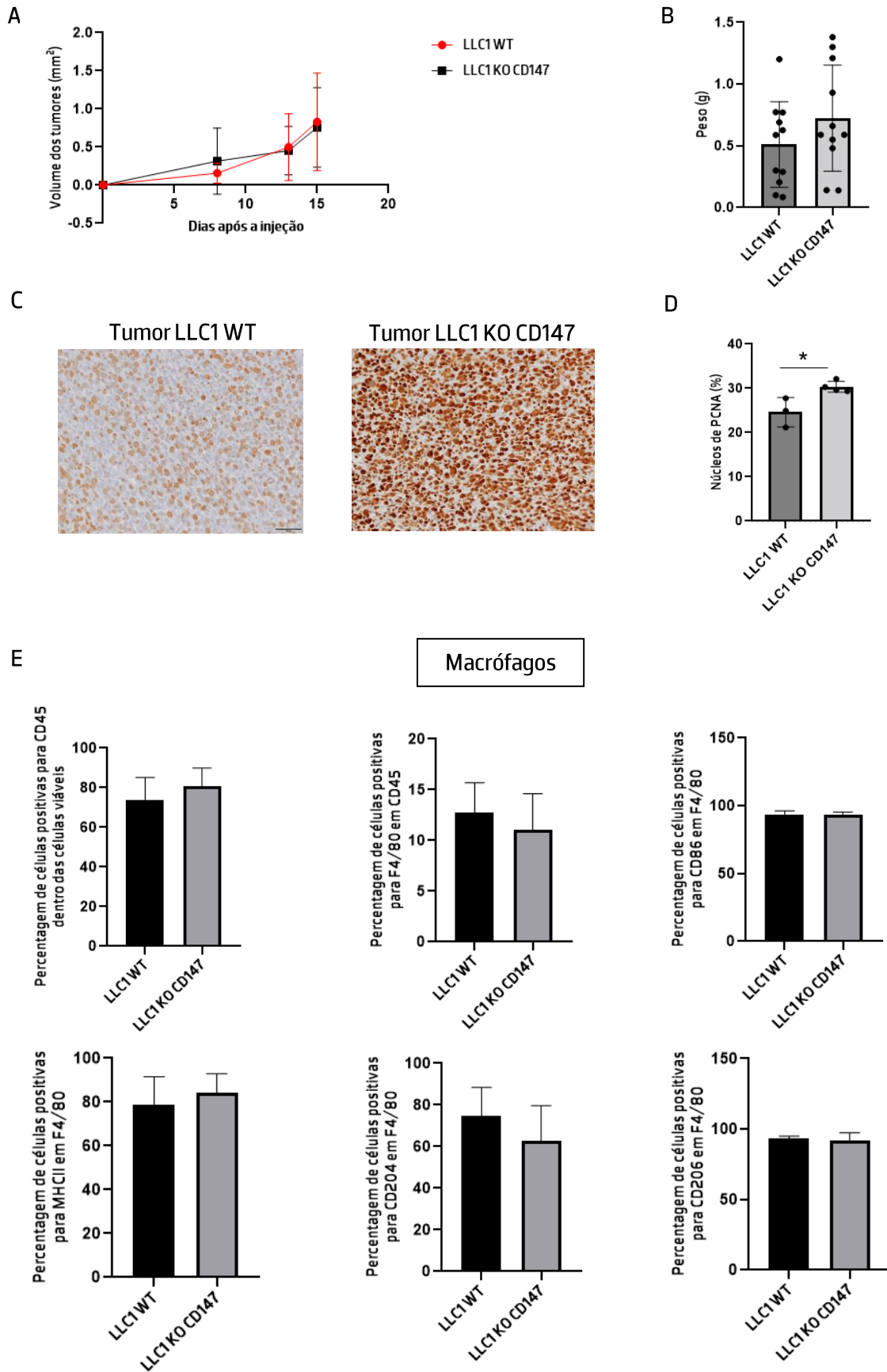
Figura 3 – Metabolismo celular da linha LLC1. A Consumo de glicose na linha LLC1. B Lactato extracelular na linha LLC1WT e LLC1KOCD147. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão; \* $p < 0,05$  pelo teste T Student.

### 4.4. O efeito do bloqueio da CD147 no crescimento tumoral *in vivo* e na população imune dos tumores.

Vários estudos mostram que o lactato resultante do metabolismo do tumor, altera a função das células do sistema imunitário, criando um microambiente tumoral imunossupressor (49), no entanto o papel da CD147 na imunossupressão tumoral ainda não está claro. Assim, avaliou-se o efeito da CD147 na imunossupressão tumoral, *in vivo*. Injetou-se subcutaneamente células LLC1WT e LLC1KOCD147, em ratinhos C57BL6. O crescimento tumoral foi avaliado através da medição do tamanho do tumor com um calliper ao longo do tempo. No final o peso dos tumores foi registado e recolhidos para análise por IHQ ou citometria de fluxo.

Inicialmente os tumores sem a CD147 tiveram um ligeiro aumento de volume até ao dia 9, que decresceu até ao dia 15. O peso dos tumores é maior nos tumores sem a CD147 (Figura 4A e B), mas estes resultados não foram estatisticamente significativos. Posto isto, para confirmar a diferença de proliferação dos tumores dos dois grupos de tumores, usou-se o anticorpo anti-PCNA na imunohistoquímica. A PCNA (antígeno nuclear de célula proliferativa), é encontrado em células que se

encontram em divisão. Os tumores dos animais injetados com a linha LLC1KOCD147 tiveram uma maior marcação nuclear do marcador PCNA ( $p=0,0223$ ), e por isso apresentavam uma maior proliferação, em comparação aos tumores injetados com a linha LLC1WT (Figura 4C e D). Por fim, a citometria de fluxo foi realizada para identificar a população imune de macrófagos e linfócitos T. O bloqueio da CD147 não alterou a porcentagem de leucócitos ( $CD45^+$ ) nem de macrófagos ( $F4/80^+$ ), e através da análise dos marcadores CD86 e MCHII; e CD204 e CD206, verificou-se que a CD147 não teve influência na polarização dos macrófagos do tipo M1 nem do tipo M2, respectivamente. No entanto, o silenciamento da CD147, levou a um aumento de PD-L1 presente nos macrófagos ( $p=0,0161$ ). No que diz respeito aos marcadores dos linfócitos T, mais uma vez o bloqueio da CD147 não alterou a porcentagem de células TCD8<sup>+</sup> e das células TCD4<sup>+</sup>, nem do PD1 presente nestes dois tipos de células do sistema imunitário. Porém, o silenciamento da CD147 diminuiu o marcador de ativação CD69 nas células TCD8<sup>+</sup> ( $p=0,0228$ ). Relativamente às células Treg ( $CD25^+FOXP3^+$ ) e seus estado de ativação ( $CD4^+FOXP3$ ), a CD147 não teve qualquer influência na porcentagem nem ativação destas células do sistema imunitário.



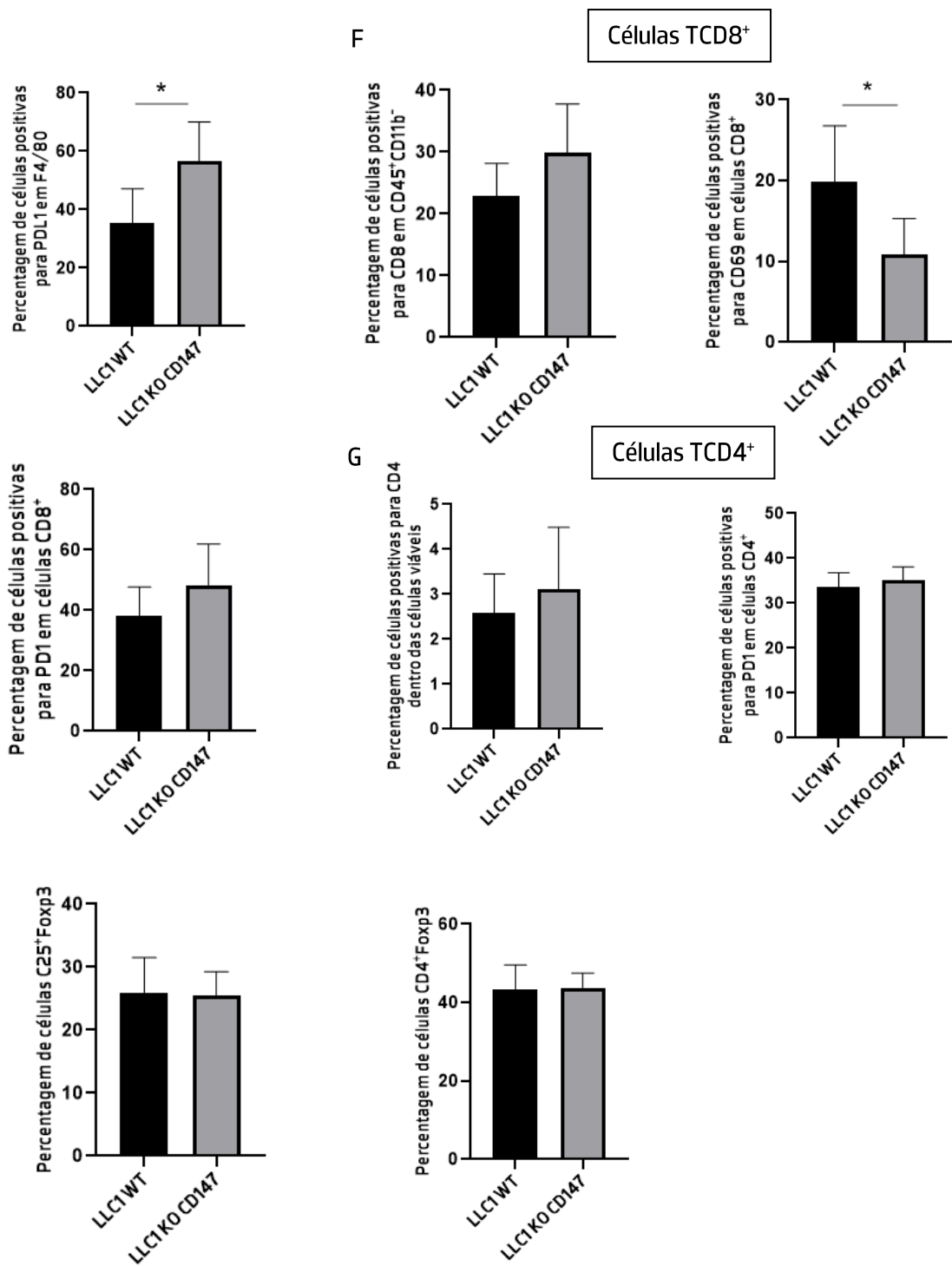


Figura 4 - As células LLC1 foram injetadas ( $1 \times 10^6$ ) em ratinhos C57BL6. **A** Volume dos tumores. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão. **B** Peso dos tumores medido após a remoção dos tumores dos animais. **C** Análise imuno-histoquímica de tumores para PCNA (Magnitude, 200x). Expressão nuclear da proteína PCNA. Barra de escala, 50  $\mu$ m. **D** Percentagem de marcação PCNA de tumores usando imageJ. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão; \* $p < 0,05$ . O teste T student foi aplicado. **E**, **F** e **G** Citometria de fluxo de marcadores de superfície macrófagos e células T. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão; \* $p < 0,05$ . O teste T student foi aplicado.

## 5. Discussão

As células tumorais apresentam uma elevada plasticidade metabólica, fazendo com que estas tenham a capacidade de se adaptarem a condições adversas. Desta forma, surge o conceito do efeito de Warburg, que permite às células tumorais, obter rapidamente ATP e consequentemente suportar as elevadas taxas de proliferação dos tumores, mesmo na presença de oxigénio. No final, é originado lactato, que é acumulado no microambiente tumoral, resultado de um metabolismo desequilibrado. Sabe-se que o lactato exerce um papel crítico no desenvolvimento do tumor, pois inibe a função das células do sistema imunitário, promove a polarização de macrófagos pró-tumorais e está também ligado à angiogénese. O movimento do lactato é feito através dos MCTs que estão associados à proteína CD147, sugerindo um papel importante da CD147 na regulação do metabolismo tumoral (50). Foi relatado que o bloqueio da CD147 diminui a taxa glicolítica e o efluxo de lactato em linhas celulares de carcinoma hepatocelular, e que desta forma mostra o envolvimento de CD147 no metabolismo (51). Diversos estudos mostraram que a sobreexpressão da CD147 está associada a um mau prognóstico dos pacientes com cancro, e que esta é altamente expressa em diversos tumores, incluindo tumores de cancro do pulmão, mama, rim, cólon, próstata e fígado (50). Já é conhecido o papel multifuncional da CD147 em determinadas características das células tumorais. Foi observado que a CD147 é capaz de promover a proliferação, invasão e metastização celular, tal como a angiogénese (52).

Posto isto, o presente estudo, procurou investigar melhor o papel da CD147 na imunossupressão do cancro do pulmão. Para tal, foi usada a linha celular de carcinoma do pulmão de Lewis (LLC1), onde já tinha sido realizado o bloqueio da CD147 pelo método CRISP-Cas9. Desta forma, foi necessário comprovar o bloqueio da CD147 recorrendo a duas técnicas, RT-qPCR e Western Blot. Apesar de não ter havido o bloqueio total da CD147, foi possível observar a diminuição evidente do mRNA e dos níveis de proteína na linha LLC1KOCD147.

Em seguida, caracterizou-se o efeito do bloqueio da CD147 na viabilidade celular e na capacidade de formação de estruturas 3D-esferóides. Embora tenha sido observada uma tendência para o aumento da viabilidade na linha LLC1WT em comparação à LLC1KOCD147, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos. O mesmo aconteceu, num estudo feito com uma linha celular de humana adenocarcinoma do pulmão (A549), onde a linha A549WT teve uma viabilidade celular ligeiramente maior que a A549KOCD147, no entanto também sem significado estatístico (53). Como, este estudo, a partir das 24 horas, houve uma tendência para aumentar a viabilidade celular, e de maneira a perceber se esta viabilidade iria continuar a aumentar de maneira significativa, em estudos futuros seria relevante prolongar o tempo do ensaio. No entanto, esta linha celular não aguenta estar em cultura muito confluenta pois acabam por desaderir, e por essa razão, teria de se recorrer a outro tipo de técnica, como o ensaio brometo de 3-(4,5 - dimetiltiazol -2- il)-2,5-difenil tetrazólio

(MTT) até 96 horas, sugerido pelo estudo feito por *Meng et al* (54). O ensaio MTT, mede a atividade mitocondrial e, conseqüentemente a viabilidade celular, onde o composto MTT é convertido em formazan, por células viáveis (55). Além disso, também se poderia usar o corante Trypan Blue para contar células viáveis. Como as células viáveis têm membranas intactas, não deixam entrar este corante para o seu interior, enquanto as células mortas sim. Esta técnica consiste na contagem das células que excluem o corante Trypan Blue, que se traduzem em células viáveis (56). Para colmatar a informação relativamente à viabilidade celular, foi realizado o ensaio dos esferoides, uma vez que este tipo de estruturas mimetizam a difusão de nutrientes que são importantes para o crescimento tumoral. De acordo com a pesquisa feita, não foi encontrada qualquer relação entre o papel da CD147 em estruturas 3D. Deste modo, foi analisado a formação do esferoide e observou-se que a CD147 não teve qualquer influência no crescimento dos esferoides ao longo dos dias. Portanto, neste estudo a inibição da CD147 não teve influência na viabilidade celular *in vitro*, nem na formação de esferoides nesta linha celular.

Posto isto, como a CD147 está implicada no metabolismo tumoral, uma vez que se associa aos MCTs, foi avaliada a expressão dos transportadores MCT1 e MCT4 nas células. A expressão diminuída da CD147, levou à diminuição dos transcritos do MCT1 e MCT4, mas curiosamente não afetou os níveis proteicos destes MCTs. Este resultado contraria o estudo feito por *Xiofeng Li. et al*, que demonstraram que ao bloquear a CD147, a expressão das proteínas MCT1 e MCT4 diminuía (26). No entanto, apesar da proteína estar presente, esta pode-se encontrar no citoplasma, e, portanto, não sendo funcional no transporte do lactato. Desta forma, para estudar a localização dos MCTs, poderíamos recorrer a ensaios de imunohistoquímica/imunofluorescência ou por Western Blot com a extração de proteína por fracionamento. Como as células tumorais apresentam um aumento da glicólise e dependem grande parte desta via metabólica para gerar ATP para suportar as elevadas taxas de proliferação, e conseqüentemente há um aumento do lactato que é exportado para o meio extracelular (57), foi visto se a CD147 poderia ser um regulador chave da proliferação celular através da alteração do metabolismo da glicose. No presente estudo, houve uma tendência diminuída no consumo de glicose quando houve o bloqueio da CD147, esta não foi estatisticamente significativa. No entanto, apesar de não ter sido uma diminuição acentuada, o bloqueio da CD147 levou à diminuição do lactato extracelular. Sabe-se que o lactato é exportado para o meio extracelular via MCT4, e um estudo mostrou que o exporte do lactato foi diminuído devido à diminuição da expressão do MCT4, conseqüência do bloqueio da CD147 (33,60). Mas neste caso, não foi possível tirar a mesma conclusão, uma vez que o Western Blot mostrou que não houve alteração dos níveis dos transportadores quando a CD147 foi bloqueada. Por isso, para perceber se o MCT4 está aqui envolvido no acúmulo de lactato no meio extracelular, futuramente seria interessante fazer KO do MCT4, por exemplo através da técnica CRISP-Cas9, na linha celular LLC1. Assim, se os resultados forem os mesmos, sugere que o efluxo de lactato é devido a

outro transportador presente na membrana das células tumorais, como o MCT1, que também é capaz de exportar lactato (60,61). Já se os resultados mostrarem que há diminuição do lactato extracelular quando é feito o nocaute do MCT4, indica que o MCT4 tem um papel importante no transporte de lactato. Assim, o nosso achado, sugere que o MCT1 e MCT4 possam usar outra chaperona para se manterem na membrana plasmática e exerçam a sua função, como por exemplo a CD44 (53,60).

Uma outra característica da CD147, que foi inicialmente descrita por ser uma proteína que induz a produção de MMPs (7), logo no sentido de complementar esta tese, em estudos futuros, seria importante avaliar a migração das células tumorais LLC1, por exemplo recorrendo ao ensaio de ferida (do inglês *wound*) tal como sugerido no estudo feito por *Siqui Pan et al.* Este é um ensaio fácil e rápido, que consiste fazer uma ferida em células em monocamada, onde a capacidade de migração é calculado através do fechamento da ferida (61).

Posto isto, avaliou-se o efeito da CD147 *in vivo*, para melhor caracterizar a influência da CD147 no cancro do pulmão. Ou seja, os ratinhos C57BL6 machos foram injetados com a linha LLC1 e no final, os tumores foram recolhidos e envolvidos em parafina para a realização de uma imunohistoquímica, e processados para realização de citometria de fluxo. Assim, foi realizada uma imunohistoquímica dos tumores marcados com o anticorpo anti-PCNA. Os tumores deficientes em CD147 obtiveram uma maior marcação nuclear de PCNA, cerca de 4 vezes maior, que se traduz por uma maior proliferação celular, do que os tumores com CD147, o que está em concordância com os pesos dos tumores. Este resultado está de acordo com o ensaio realizado com a linha A549, onde o crescimento tumoral dos ratinhos injetados com a linha A549KOC147 também foi aproximadamente maior 4 vezes do que com a linha A549WT (53). Ao contrário do que está na literatura, este resultado parece mostrar que a CD147 tem um papel supressor do tumor. Além disso, estudos *in vitro* com a linha celular A549, feito por *Shaoxing Yang et al.* mostraram que a CD147 ao ser silenciada, a proliferação das células A549KOC147 diminuiu em comparação à linha A549WT (52). No entanto, as células cultivadas em monocamada *in vitro* não traduzem as reais interações entre as células tumorais e o microambiente que é formado nos tumores.

A evasão imune é outra característica do tumor, e diversas investigações têm sugerido cada vez mais que o metabolismo glicolítico e a evasão imunológica estão ligados, apesar de frequentemente sejam estudados como processos distintos. Sabe-se que as células tumorais têm uma elevada dependência da glicólise, tendo uma grande consequência a nível das células imunes presentes no microambiente tumoral, que competem com as células tumorais pela glicose para poderem-se proliferar e exercerem as suas funções anti-tumorais. Esta escassez de nutrientes forçada pelas células tumorais, resulta numa atividade anti-tumoral comprometida. Além disso, o lactato que provém do metabolismo das células tumorais, têm efeitos inibitórios nas células do sistema imune. Como a CD147 está ligada ao metabolismo tumoral por se associar aos transportadores de monocarboxilato, o estudo *in vivo*

também teve como objetivo, explorar o papel da CD147 na imunossupressão tumoral, onde foram avaliados dois tipos de população imune, os macrófagos e os linfócitos T.

Os resultados no presente estudo mostraram que não houve diferenças a nível da percentagem de leucócitos entre os tumores injetados com a linha LLC1WT e LLC1KOCD147, pois a percentagem de CD45 é igual. Não houve diferenças nos marcadores CD86 nem MHCII, o que quer dizer que o bloqueio da CD147 não alterou a polarização dos macrófagos do tipo M1. Para além disso, o silenciamento da CD147 também não teve influência na polarização dos macrófagos do tipo M2, uma vez que não se verificou diferença dos marcadores CD204 e CD206. Por isso, não obtivemos diferenças no número de macrófagos nem na sua polarização, quando a CD147 estava ausente. No entanto, a expressão da CD147 correlacionou-se inversamente com os macrófagos que expressavam PD-L1. O PD-L1 além de ser expresso em células tumorais, encontra-se também noutra tipo de células, como células hematopoiéticas, incluindo células T, células B, células dendríticas e macrófagos. O PD-L1 é um regulador negativo das respostas de células T, pois inibem a sua proliferação e produção de citocinas (62). Este resultado pode indicar um aumento de imunossupressão quando a CD147 está ausente. Relativamente aos linfócitos, foram analisadas as subpopulações TCD8 e TCD4. A nível das células TCD8, verificámos que houve uma tendência para o seu aumento, tal como as células CD8 que expressavam PD1, nos tumores dos ratinhos injetados com LLC1KOCD147, apesar destas diferenças não serem estatisticamente significativas. Este aumento do PD1 está de acordo com o aumento do PDL1 em macrófagos, apesar de não terem diferenças estatísticas. No entanto, houve uma diminuição significativa do marcador de ativação CD69 em células TCD8<sup>+</sup>, o que significa que as células T citotóxicas estão menos ativas e por isso, temos uma maior imunossupressão. Apesar de haver um aumento das células TCD8, estas não parecem estar ativas devido à diminuição do marcador CD69. Além disso, os linfócitos TCD8 podem estar a ser inibidos pelos macrófagos, devido ao aumento de PD1 e PD-L1. Por último, não foi observado diferenças nas células TCD4 entre os dois grupos, tal como a expressão do PD1 em células TCD4, contrariamente ao que acontece nos linfócitos TCD8. Além disso, a população das células Tregs (CD4<sup>+</sup>FOXP3) e o seu estado de ativação (CD25<sup>+</sup>FOXP3), não tiveram alteração nos seus níveis quando a CD147 foi bloqueada. É sabido que o lactato, proveniente do metabolismo da glicose do tumor, aumenta a população de células imunossupressoras, como é o caso das células Treg (26). Sugerindo, neste estudo que as células Tregs não contribuíram para a imunossupressão, tal como as células TCD4.

## 6. Conclusão

Sabe-se que a CD147 se correlaciona com os transportadores de monocarboxilato, no entanto no presente estudo, o bloqueio da CD147 não fez com que os níveis proteicos dos MCTs diminuíssem, tal como seria de esperar. No entanto, o bloqueio da CD147 foi capaz de fazer com que o lactato extracelular diminuísse, sugerindo que o MCT1 e MCT4 têm outra chaperona como a CD44. Para além disso, o bloqueio da CD147 na linha LLC1 não teve qualquer efeito na viabilidade celular, nem na formação dos esferoides.

Posto isto, foi avaliado o efeito da CD147 *in vivo*, para melhor compreensão da influência da CD147 no cancro do pulmão. E para tal, os ratinhos C57BL6 machos foram injetados com a linha LLC1 e no final, os tumores foram recolhidos para a realização de uma imunohistoquímica, e citometria de fluxo. A CD147, ao contrário do que mostra a literatura, neste estudo parece ser uma proteína supressora tumoral *in vivo*, pois os tumores dos animais injetados com a linha LLC1 WT obtiveram tumores com menor marcação nuclear do marcador de proliferação PCNA do que os tumores sem CD147. Houve ainda um aumento do marcador PD-L1 nos macrófagos quando a CD147 estava ausente, sugerindo que o bloqueio da CD147 leva a um aumento da imunossupressão. Para complementar esta hipótese, houve uma diminuição significativa do marcador de ativação CD69 em células TCD8<sup>+</sup>, quando a CD147 se encontra bloqueada, o que significa que as células T citotóxicas estão menos ativas e conseqüentemente, tem-se uma maior imunossupressão. Embora tenha havido um aumento das células TCD8, estas não parecem estar ativas devido à diminuição do marcador CD69. Além disso, devido ao aumento de PD1 e PD-L1, os linfócitos TCD8 podem estar a ser inibidos pelos macrófagos. Esta dissertação, indicou que o bloqueio da CD147 levou a um aumento da imunossupressão tumoral. No entanto, novos estudos *in vivo* e *in vitro* são precisos, para entender melhor a relação da CD147 com a imunossupressão tumor.

## 7. Referências Bibliográficas

1. Bade BC, Dela Cruz CS. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med.* 2020;41(1):1–24.
2. Zhang T, Jia Y, Yu Y, Zhang B, Xu F, Guo H. Targeting the tumor biophysical microenvironment to reduce resistance to immunotherapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2022;186:114319.
3. Villaruz LC, Kalyan A, Zarour H, Socinski MA. Immunotherapy in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2014;3(1):2–14.
4. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OUI, Yang YW, Buchanan P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta – Rev Cancer.* 2015;1856(2):189–210.
5. Baudin E, Caplin M, Garcia-Carbonero R, Fazio N, Ferolla P, Filosso PL, et al. Lung and thymic carcinoids: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2021;32(4):439–51.
6. Hosseini A, Gharibi T, Marofi F, Babaloo Z, Baradaran B. CTLA-4: From mechanism to autoimmune therapy. *Int Immunopharmacol.* 2020;80(January).
7. Landras A, de Moura CR, Jouenne F, Lebbe C, Menashi S, Mourah S. CD147 is a promising target of tumor progression and a prognostic biomarker. *Cancers (Basel).* 2019;11(11):1–17.
8. Hu X, Su J, Zhou Y, Xie X, Peng C, Yuan Z, et al. Repressing CD147 is a novel therapeutic strategy for malignant melanoma. *Oncotarget.* 2017;8(15):25806–13.
9. Kumar D, Vetrivel U, Parameswaran S, Subramanian KK. Structural insights on druggable hotspots in CD147: A bull's eye view. *Life Sci.* 2019;224(January):76–87.
10. Hanna SM, Kirk P, Holt OJ, Puklavec MJ, Brown MH, Barclay AN. A novel form of the membrane protein CD147 that contains an extra Ig-like domain and interacts homophilically. *BMC Biochem.* 2003;4:1–9.
11. Belton RJ, Chen L, Mesquita FS, Nowak RA. Basigin-2 is a cell surface receptor for soluble basigin ligand. *J Biol Chem.* 2008;283(26):17805–14.
12. Yu XL, Hu T, Du JM, Ding JP, Yang XM, Zhang J, et al. Crystal structure of HA18G/CD147: Implications for immunoglobulin superfamily homophilic adhesion. *J Biol Chem.* 2008;283(26):18056–65.
13. Yoshida S, Shibata M, Yamamoto S, Hagihara M, Asai N, Takahashi M, et al. Homo-oligomer formation by basigin, an immunoglobulin superfamily member, via its N-terminal immunoglobulin domain. *Eur J Biochem.* 2000;267(14):4372–80.
14. Brunet S, Sardon T, Zimmerman T, Wittmann T, Pepperkok R, Karsenti E, et al. Characterization of the TPX2 Domains Involved in Microtubule Nucleation and Spindle Assembly in *Xenopus* nucleation around chromatin and functions in a network of other molecules, some of which also

- are regulated by. *Mol Biol Cell*. 2004;15(December):5318–28.
15. Egawa N, Koshikawa N, Tomari T, Nabeshima K, Isobe T, Seiki M. Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP/MMP-14) cleaves and releases a 22-kDa extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) fragment from tumor cells. *J Biol Chem*. 2006;281(49):37576–85.
  16. Kuang YH, Liu YJ, Tang LL, Wang SM, Yan GJ, Liao LQ. Plasma soluble cluster of differentiation 147 levels are increased in breast cancer patients and associated with lymph node metastasis and chemoresistance. *Hong Kong Med J*. 2018;24(3):252–60.
  17. Lee A, Rode A, Nicoll A, Maczurek AE, Lim L, Lim S, et al. Circulating CD147 predicts mortality in advanced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016;31(2):459–66.
  18. Philp NJ, Ochrietor JD, Rudoy C, Muramatsu T, Linser PJ. Loss of MCT1, MCT3, and MCT4 expression in the retinal pigment epithelium and neural retina of the 5A11/basigin-null mouse. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(3):1305–11.
  19. Iacono KT, Brown AL, Greene MI, Saouaf SJ. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Exp Mol Pathol*. 2007;83(3):283–95.
  20. Kanekura T, Chen X, Kanzaki T. Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *Int J Cancer*. 2002;99(4):520–8.
  21. Rucci N, Millimaggi D, Mari M, Del Fattore A, Bologna M, Teti A, et al. Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand enhances breast cancer-induced osteolytic lesions through upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147. *Cancer Res*. 2010;70(15):6150–60.
  22. Ke X, Li L, Dong HL, Chen ZN. Acquisition of anoikis resistance through CD147 upregulation: A new mechanism underlying metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Lett*. 2012;3(6):1249–54.
  23. Quemener C, Gabison EE, Naïmi B, Lescaille G, Bougateg F, Podgorniak MP, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer up-regulates the urokinase-type plasminogen activator system promoting tumor cell invasion. *Cancer Res*. 2007;67(1):9–15.
  24. Hegedus C, Szakács G, Homolya L, Orbán TI, Telbisz Á, Jani M, et al. Ins and outs of the ABCG2 multidrug transporter: An update on in vitro functional assays. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(1):47–56.
  25. Zhou S, Liao L, Chen C, Zeng W, Liu S, Su J, et al. CD147 mediates chemoresistance in breast cancer via ABCG2 by affecting its cellular localization and dimerization. *Cancer Lett*. 2013;337(2):285–92.
  26. Li X, Zhang Y, Ma W, Fu Q, Liu J, Yin G, et al. Enhanced glucose metabolism mediated by CD147 contributes to immunosuppression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*.

- 2020;69(4):535–48.
27. Pouysségur J, Marchiq I, Parks SK, Durivault J, Ždravlević M, Vucetic M. 'Warburg effect' controls tumor growth, bacterial, viral infections and immunity – Genetic deconstruction and therapeutic perspectives. *Semin Cancer Biol.* 2022;(July).
  28. Halestrap AP, Meredith D. The SLC16 gene family – From monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2004;447(5):619–28.
  29. Puri S, Juvala K. Monocarboxylate transporter 1 and 4 inhibitors as potential therapeutics for treating solid tumours: A review with structure–activity relationship insights. *Eur J Med Chem.* 2020;199:112393.
  30. Sharma D, Singh M, Gupta R, Kumar V, Kumar V, Rani R. Advances in Cancer Biology – Metastasis Intervention on lactate in cancer : A promising approach for the development of cancer therapeutics. *Adv Cancer Biol – Metastasis.* 2022;5(July):100058.
  31. Zhang Y, Zhang X, Meng Y, Xu X, Zuo D. International Immunopharmacology The role of glycolysis and lactate in the induction of tumor–associated macrophages immunosuppressive phenotype. *Int Immunopharmacol.* 2022;110(January):108994.
  32. Koo S jie, Garg NJ. Metabolic programming of macrophage functions and pathogens control. *Redox Biol.* 2019;24(March):101198.
  33. Galdiero MR, Bonavita E, Barajon I, Garlanda C, Mantovani A, Jaillon S. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology.*
  34. Certo M, Tsai CH, Pucino V, Ho PC, Mauro C. Lactate modulation of immune responses in inflammatory versus tumour microenvironments. *Nat Rev Immunol.* 2021;21(3):151–61.
  35. Chen P, Zuo H, Xiong H, Kolar MJ, Chu Q, Saghatelian A, et al. Gpr132 sensing of lactate mediates tumor–macrophage interplay to promote breast cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(3):580–5.
  36. Kes MMG, Van den Bossche J, Griffioen AW, Huijbers EJM. Oncometabolites lactate and succinate drive pro–angiogenic macrophage response in tumors. *Biochim Biophys Acta – Rev Cancer.* 2020;1874(2):188427.
  37. Zhang D, Tang Z, Huang H, Zhou G, Cui C, Weng Y, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature.* 2019;574(7779):575–80.
  38. Labani–Motlagh A, Ashja–Mahdavi M, Loskog A. The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses. *Front Immunol.* 2020;11(May):1–22.
  39. Wang ZH, Peng WB, Zhang P, Yang XP, Zhou Q. Lactate in the tumour microenvironment: From immune modulation to therapy. *EBioMedicine.* 2021;73:103627.
  40. Beatty GL, Paterson Y. IFN- $\gamma$ –Dependent Inhibition of Tumor Angiogenesis by Tumor–

- Infiltrating CD4 + T Cells Requires Tumor Responsiveness to IFN- $\gamma$  . *J Immunol.* 2001;166(4):2276–82.
41. Worsley CM, Veale RB, Mayne ES. The acidic tumour microenvironment: Manipulating the immune response to elicit escape. *Hum Immunol.* 2022;83(5):399–408.
  42. Wu AA, Drake V, Huang HS, Chiu SC, Zheng L. Reprogramming the tumor microenvironment: tumor-induced immunosuppressive factors paralyze T cells. *Oncoimmunology.* 2015;4(7):1–14.
  43. Fischbeck AJ, Ruehland S, Ettinger A, Paetzold K, Masouris I, Noessner E, et al. Tumor Lactic Acidosis: Protecting Tumor by Inhibiting Cytotoxic Activity Through Motility Arrest and Bioenergetic Silencing. *Front Oncol.* 2020;10(December):1–14.
  44. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials.* 2016;39(1):98–106.
  45. Ribeiro Franco PI, Rodrigues AP, de Menezes LB, Pacheco Miguel M. Tumor microenvironment components: Allies of cancer progression. *Pathol Res Pract.* 2020;216(1):152729.
  46. Angelin A, Gil-de-Gómez L, Dahiya S, Jiao J, Guo L, Levine MH, et al. Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. *Cell Metab.* 2017;25(6):1282–1293.e7.
  47. Watson MLJ, Vignali PDA, Mullett SJ, Overacre-Delgoffe AE, Peralta RM, Grebinoski S, et al. Metabolic support of tumour-infiltrating regulatory T cells by lactic acid. *Nature.* 2021;591(7851):645–51.
  48. Cinier J, Hubert M, Besson L, Di Roio A, Rodriguez C, Lombardi V, et al. Recruitment and expansion of tregs cells in the tumor environment—how to target them? *Cancers (Basel).* 2021;13(8):1–49.
  49. Wang JX, Choi SYC, Niu X, Kang N, Xue H, Killam J, et al. Lactic acid and an acidic tumor microenvironment suppress anticancer immunity. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):1–14.
  50. Reina-Campos M, Moscat J, Diaz-Meco M. Metabolism shapes the tumor microenvironment. *Curr Opin Cell Biol.* 2017;48:47–53.
  51. Huang Q, Li J, Xing J, Li W, Li H, Ke X, et al. CD147 promotes reprogramming of glucose metabolism and cell proliferation in HCC cells by inhibiting the p53-dependent signaling pathway. *J Hepatol.* 2014;61(4):859–66.
  52. Yang S, Qi F, Tang C, Wang H, Qin H, Li X, et al. CD147 promotes the proliferation, invasiveness, migration and angiogenesis of human lung carcinoma cells. *Oncol Lett.* 2017;13(2):898–904.
  53. Granja S, Marchiq I, Le Floch R, Moura CS, Baltazar F, Pouysségur J. Disruption of BASIGIN decreases lactic acid export and sensitizes non-small cell lung cancer to biguanides independently of the LKB1 status. *Oncotarget.* 2015;6(9):6708–21.
  54. Chuang MH, Jan MS, Chang JT, Lu FJ. The Chinese medicine JC-001 enhances the

- chemosensitivity of Lewis lung tumors to cisplatin by modulating the immune response. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17(1):1–10.
55. Van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell sensitivity assays: The MTT assay. *Methods Mol Biol*. 2011;731(July 2015):237–45.
  56. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*. 2015;111(1).
  57. Baba M, Inoue M, Itoh K, Nishizawa Y. Blocking CD147 induces cell death in cancer cells through impairment of glycolytic energy metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;374(1):111–6.
  58. Kanekura T, Chen X. CD147/basigin promotes progression of malignant melanoma and other cancers. *J Dermatol Sci*. 2010;57(3):149–54.
  59. Pereira-Nunes A, Simões-Sousa S, Pinheiro C, Miranda-Gonçalves V, Granja S, Baltazar F. Targeting lactate production and efflux in prostate cancer. *Biochim Biophys Acta – Mol Basis Dis*. 2020;1866(11):165894.
  60. Slomiany MG, Daniel Grass G, Robertson AD, Yang XY, Maria BL, Beeson C, et al. Hyaluronan, CD44, and emmprin regulate lactate efflux and membrane localization of monocarboxylate transporters in human breast carcinoma cells. *Cancer Res*. 2009;69(4):1293–301.
  61. Pan S, Su Y, Sun B, Hao R, Gao X, Han B. Knockout of CD147 inhibits the proliferation, invasion, and drug resistance of human oral cancer CAL27 cells in Vitro and in Vivo. *Int J Biol Macromol*. 2021;181:378–89.
  62. Cai J, Qi Q, Qian X, Han J, Zhu X, Zhang Q, et al. The role of PD-1/PD-L1 axis and macrophage in the progression and treatment of cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019;145(6):1377–85.