UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

EFEITOS DA SEROTONINA NA TUMORIGÊNESE: implicações na glicólise e sinalização celular

JAMILLE MANSUR ALBANESE

JAMILLE MANSUR ALBANESE

EFEITOS DA SEROTONINA NA TUMORIGÊNESE: IMPLICAÇÕES NA GLICÓLISE E SINALIZAÇÃO CELULAR

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Patricia Zancan

CIP - Catalogação na Publicação

M325e

Mansur Albanese, Jamille

Efeitos da Serotonina na Tumorigênese: implicaações na glicólise e sinalização celular / Jamille Mansur Albanese. -- Rio de Janeiro, 2017.

Orientadora: Patricia Zancan.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, 2017.

1. Serotonina. 2. Câncer de mama. 3. Sinalização celular. I. Zancan, Patricia, orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Jamille Mansur Albanese

EFEITOS DA SEROTONINA NA TUMORIGÊNESE: IMPLICAÇÕES NA GLICÓLISE E SINALIZAÇÃO CELULAR

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro visando à obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

Rio de Janeiro,/
Banca Examinadora:
Dra. Patricia Zancan Profa. Associado da Faculdade de Farmácia, UFRJ (Orientadora)
Dra. Luciana Pizzatti Barboza Profa. Adjunta do Instituto de Química, UFRJ
Dr. Bruno Lourenço Diaz Prof. Associado do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ
Dr.ª Denise Pires de Carvalho Prof.ª Titular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ
Dr.ª Elis Cristina Araujo Eleutherio Prof.ª Associado do Instituto de Química, UFRJ (Suplente)
Dr.ª Jamila Alessandra Perini Machado Prof.ª Adjunta no Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, UEZO

(Suplente)



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Oncobiologia Molecular (LabOMol), do Departamento de Biotecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, CCS - UFRJ, sob a orientação da Professora Patricia Zancan. O projeto obteve apoio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

À minha mãe, Tudo em você me desperta para o que de melhor e mais intenso pode ser viver.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço aos meus pais, Sonia e Marco Aurelio, por sempre me incentivarem a batalhar pelo que eu acredito. Por todo o amor, dedicação e carinho, que nunca se fizeram ausentes, mesmo à distância desde muito cedo;
- Agradeço às minhas irmãs, Andrezza e Anna Luiza, por terem sido o meu porto seguro desde pequenininhas. Vocês sempre confiaram e acreditaram nas minhas escolhas e estão por trás dessa conquista;
- Aos meus avós, por acreditarem que eu sou muito melhor do que penso.
 Pode não ser verdade, mas sempre desperta o meu melhor lado;
- À minha orientadora, Patricia Zancan, por ter aberto as portas do seu laboratório sem nem me conhecer. Você sempre me fez acreditar que tudo daria certo e estamos aqui!
- Agradeço ao professor Mauro Sola-Penna, por todas as discussões científicas que tivemos. Elas sempre me estimularam a querer aprender mais e desenvolver meu pensamento crítico;
- O Ao professor Renato Sampaio Carvalho, por ter me recebido e me ensinado, com toda paciência, boa parte das técnicas que eu sei hoje. Aprendi com o melhor!
- Aos amigos dos laboratórios LabOMol e LabECoM e àqueles que já passaram por eles durante minha presença. Com todos vocês eu me diverti e me estressei (rs). Obrigada pela paciência, companheirismo, risadas e colaborações nesses dois anos. Vocês me ensinaram muito e espero deixar um pouco de mim aqui. Agradeço de forma especial à Priscila, pela companhia, ideias e discussões nos últimos dias de escrita e ao João, sempre prestativo, pela ajuda na formatação;

- Á Priscila, João, Lili, Thainá, David e Heitor. Obrigada pela diversão, conversas, conselhos e cervejas. Vocês não tem base do quanto são importantes pra mim;
- Ao Ricardo por ter sido o primeiro rosto amigo no laboratório. Você sempre me ouviu e aconselhou, me entendendo e ajudando a manter a sanidade.
 Muito obrigada por todos esses momentos!!!
- Aos meus amigos Adalgisa, Renan, Alessandro e Juvissan. Obrigada pela companhia, quase diária, no Fundão e principalmente fora de lá. Vocês sempre me falaram não o que eu queria, mas o que eu precisava ouvir e se fizeram família quando a minha estava longe;
- Aos professores Luciana Barboza, Bruno Diaz, Denise de Carvalho, Elis Eleutherio e Jamila Perini, por terem aceitado o convite para fazer parte da banca desta dissertação e pelas considerações que serão feitas.

"Ciência é a maneira de provar que estavam errados todos os acertos da ciência" Autor desconhecido

RESUMO

ALBANESE, J. M. Efeitos da serotonina na tumorigênese: implicações na glicólise e sinalização celular. 2017. 56p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Bioquímica. Instituto de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. RJ. 2017.

O termo tumor ou neoplasia caracteriza-se por uma massa anormal de tecido com altas taxas proliferativas e fluxo glicolítico rápido. A eficiência glicolítica em tumores é conhecida como glicólise aeróbica ou Efeito Warburg. A ação hormonal da serotonina (5-HT) tem implicações em muitos processos fisiológicos e patológicos. Uma das propriedades mais intrigantes é a capacidade de regular processos mitogênicos. Já foi mostrado que a 5-HT aumenta a viabilidade de células de câncer de mama, mas sem nenhum estudo mecanístico, sendo este o objetivo do nosso trabalho. Neste trabalho, mostramos que a 5-HT promove um aumento do fluxo glicolítico, em células MCF-7, através do controle das três principais enzimas da glicólise, hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK) e piruvato quinase (PK). Esta modulação positiva ocorre devido à ligação do hormônio ao seu receptor acoplado à proteína G, ativando a fosfolipase C (PLC), que vai recrutar a proteína quinase C (PKC) e a calmodulina, com consequente ativação da calmodulina cinase II (CaMKII). Por outro lado, esta sinalização também envolve a ativação de tirosinas quinases (TK) e da piruvato quinase A (PKA). Observamos também que o estímulo serotonérgico vai interferir negativamente na sinalização insulínica, através da fosforilação do substrato do receptor de insulina, no resíduo S1101. Nossos resultados também mostraram que a 5-HT promove um estresse energético para a célula, resultado do baixo conteúdo de ATP, ativando AMPK. Com isso, sugerimos que a 5-HT é capaz de regular o fluxo glicolítico e ativar vias de sinalização relacionadas com proliferação e sobrevivência celular.

Palavras-chave: Câncer de mama, serotonina, sinalização celular.

ABSTRACT

The term tumor or neoplasia is characterized by an abnormal tissue bulk with high proliferative rates and rapid glycolytc flux. The glycolytic flux on tumors is known as aerobic glycolysis or Warburg Effect. Serotonin (5-HT) hormonal activity is implicated in many physiological and pathological processes. One of the most intriguing property is the capability of regulating mitogenic processes. It has been shown that 5-HT increases breast tumor cells viability, but with no mechanistic study, being this the aim of our study. On this study, we have shown that 5-HT promotes an increase on glycolytic flux on MCF-7 cells, by the control of three main glycolytic enzymes, hexokinase (HK), phosphofructokinase (PFK) and pyruvate kinase (PK). This positive modulation occurs due to the hormone binding to the receptor attached to G protein, activating phospholipase C (PLC), recruiting protein kinase C (PKC) and calmodulin, with following activation of calmodulin kinase II (CaMKII). On the ohter hand, this sinalization also involves the activation of tyrosine kinases (TK) and of pyruvate kinase A (PKA). We also have observed that the serotonergic stimulus is going to intefere negatively on insulinemia sinalization by the phosphorilation of the insulin receptor substrate. Our results also showed that 5-HT promotes an energetic stress to cell as a result of the low ATP content activating AMPK. So, we suggest that 5-HT is capable to regulate the glycolytic and flux and activate signalling pathways related to cell proliferation and survival.

Keywords: Breast cancer, serotonin, cell signaling.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HIAA Ácido 5-hidroxi indolacético

5-HT 5-hidroxitriptamina, serotonina

5-HT 1 a 5 -HT7 Classificação das famílias dos receptores de serotonina

5-HTP 5-hidroxitriptofano

5-HTR Receptores de serotonina

AC Adenilato ciclase

ADP Adenosina 5'difosfato

Akt Proteína quinase B

AMP Adenosina 5'minofosfato

AMPc Adenosina 3',5' monofosfato cíclico

ATP Adenosina 5'trifosfato

Ca²⁺-CaM Cálcio-calmodulina

CaMK Proteína cinase dependente de Ca²⁺-calmodulina

DAG Diacilglicerol

DMEM Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO Dimetilsulsóxido

ERK Quinase regulada por sinal extracelular

HK Hexoquinase

INCA Instituto Nacional do Câncer

IP3 Inositol 1,4,5-trifosfato

IRS Substrato do receptor de insulina

MAPK Via das quinases ativadas por sinal mitogênico

MCF-7 Linhagem celular de carcinoma mamário humano

MEK Quinase s ativadas por sinal mitogênico

mTOR Proteína de mamíferos alvo da rapamicina

MTT Brometo de 3,4,5-dimetilazol-2,5-difeniltetrazolium

NAD⁺ Nicotinamida adenina dinucleotideo oxidado
NADH Nicotinamida adenina dinucleotideo reduzido

PBS Tampão fosfato-salino

PFK Fosfofrutoquinase

PI3K Fosfatidilinositol -3-quinase

PIP2 Fosfatidilinositol bifosfato

PIP3 Fosfatidilinositol trifosfato

PK Piruvato quinase

PKA Proteína quinase A

PKC Proteína quinase C

PLC Fosfolipase C

SDS -PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SNC Sistema nervoso central

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estatítica do câncer	19
Figura 2: Características importantes apresentadas por células tumorais par transformação maligna	
Figura 3: Efeito Warburg: da glicose ao piruvato	23
Figura 4: Biossíntese e metabolismo da serotonina	25
Figura 5: Receptores de serotonina e suas principais características	26
Figura 6: Receptores de serotonina e seus efetores intracelulares	28
Figura 7: Efeitos da 5-HT sobre os parâmetros metabólicos	37
Figura 8: Quantificação das atividades enzimáticas na presença ketanserina	
Figura 9: Quantificação das atividades enzimáticas na presença de U73122	39
Figura 10: Quantificação das atividades enzimáticas na presença de 48/80	40
Figura 11: Quantificação das atividades enzimáticas na presença genisteína	
Figura 12: Quantificação das atividades enzimáticas na presença de Bis I	41
Figura 13: Quantificação das atividades enzimáticas na presença PD98059	de 42

Figura 14: Quantificação das atividades enzimáticas na presença de U012642
Figura 15: Quantificação das atividades enzimáticas na presença de H8943
Figura 16: Análise dos perfis proteicos na presença de 5-HT44
Figura 17: Análise dos perfis proteicos na presença de 5-HT, wortmanina e insulina45
Figura 18: Análise dos perfis proteicos na presença de 5-HT e IBMX46
Figura 19: Análise dos perfis proteicos na presença de 5-HT, IBMX, dorsomorfina, AICAR e insulina46
Figura 20: Quantificação do conteúdo de ATP intracelularna presença de 5-HT, insulina, AICAR, dorsomorfina e IBMX47
Figura 21: Cascata de sinalização de receptor acoplados a proteína G, culminando na ativação de MAPK e CREB49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista dos anticorpos utilizados no trabalho	.34
---	-----

SUMÁRIO

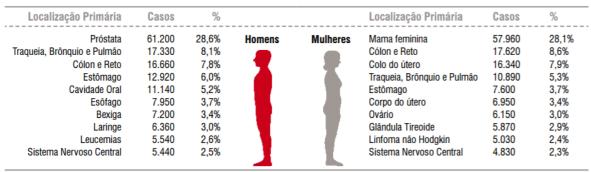
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Câncer	19
1.2 Alterações celulares na carcinogênese	21
1.2.1 Metabolismo energético	21
1.3 Serotonina (5-Hidroxitriptamina – 5-HT)	24
1.3.1 Serotonina e câncer	28
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Material	31
3.2 Cultura de células	31
3.3 Avaliação do consumo de glicose e produção de lactato	31
3.4 Avaliação da atividade mitocondrial	32
3.5 Determinação da atividade enzimas glicolíticas HK, PFK-1 e PI	K32
3.6 Dosagem do conteúdo de ATP intracelular	33
3.7 Imunoblotting	33
3.8 Análise estatística dos resultados	35
4. RESULTADOS	36
4.1 Efeitos da 5-HT no perfil metabólico	36
4.2. Efeitos da 5-HT na atividade das enzimas HK, PFK e PK	37
4.3 Avaliação dos possíveis intermediários da sinalização celula	-
4.4 Avaliação das vias de sinalização celular ativadas pela 5-HT	

5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÕES	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ESTUDO DESENVOLVIDO NO TEMPO DO TRABALHO	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Uma característica comum entre todas essas doenças é a proliferação exacerbada de células que podem invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros tecidos e órgãos através de um processo denominado metástase (OMS - Organização Mundial da Saúde, 2015). A estimativa para o biênio 2016-2017 é que ocorram cerca de 600 mil novos casos no Brasil, dentre os quais os cânceres de próstata e mama serão os mais frequentes. (**Figura 1**) (INCA - Instituto Nacional do Câncer, 2015).



^{*}Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma (Instituto Nacional do Câncer, 2015).

Com exceção do câncer de pele não melanoma, o de mama é o segundo tipo mais comum entre as mulheres no Brasil e no mundo. No Brasil, a estimativa foi de aproximadamente 57 mil novos casos em 2015. Essa doença também acomete homens, porém é raro, representando apenas 1% do total de casos da doença (INCA, 2016).

De acordo com a OMS, o câncer de mama provoca 520 mil mortes anualmente em todo o mundo. É a segunda maior causa de morte por câncer nos países desenvolvidos, atrás somente do câncer de pulmão, e a primeira maior causa de câncer nos países em desenvolvimento.

A formação do tumor ocorre através da perpetuação de alterações em um clone celular para suas células filha, devido a defeitos em mecanismos de reparo. O processo de tumorigênese, em geral ocorre lentamente e pode ser dividido em três estágios antes de chegar ao tumor: iniciação, promoção e progressão.

O estágio de iniciação é caracterizado pela instabilidade genômica que leva a lesão no DNA. Vários fatores são responsáveis por este dano, dentre eles rearranjos cromossômicos, radiação UV, agentes químicos e vírus oncogênicos. Todos estes fatores poderão gerar uma mudança irreversível do genótipo da célula normal progenitora, agindo em genes reguladores da proliferação celular. A etapa de promoção consiste na ativação de oncogenes ou inibição de genes supressores de tumor, e é denominado de promoção. As células neste estágio são denominadas "transformadas". O último estágio da carcinogênese é chamado de "progressão", onde há a mudança do microambiente celular, com o objetivo de manter o processo maligno e a capacidade de gerar metástases. Durante esta fase, são geradas condições para o crescimento das células imortalizadas, tais como produção de fatores de crescimento e citocinas (WEINBERG, 2008).

Estas neoplasias podem ser malignas ou benignas de acordo com a capacidade de divisão celular, semelhança com o tecido original e existência de risco de vida para o indivíduo afetado (MINISTÉRIO DA SAÚDE/INCA, 2014).

Tumores benignos são assim classificados por se apresentarem como uma massa de células diferenciadas que possuem estruturas e funções similares ao tecido de origem, envolvida por uma cápsula que impede a invasão de outros tecidos. Raramente apresentam risco para o indivíduo, salvo se a massa tumoral se localizar adjacente a alguma estrutura como nervos, grandes vasos sanguíneos ou órgãos vitais, como o cérebro (HUNTER; CRAWFORD; ALSARRAJ, 2008).

Tumores malignos são formados por células que podem ter perdido a sua diferenciação. São caracterizados pela sua capacidade de disseminação pelo organismo, invasão e colonização de sítios distantes da origem do tumor, por um processo conhecido como metástase (FINGER; GIACCIA, 2010).

As células cancerosas conservam algumas características da célula normal de onde se originaram. No carcinoma basocelular, tipo mais comum de câncer de pele, as células continuam produzindo os filamentos intermediários de queratina e no melanoma, produzem o pigmento melanina, característico de sua célula

precursora. Este fato dificulta a eliminação seletiva das células tumorais nas terapias da doença.

1.2 Alterações celulares na carcinogênese

Em 2011, Hanahan e Weinbergdestacaram e descreveram as principais características essenciais para o desenvolvimento carcinogênico (**Figura 2**). Células tumorais devem possuir sinal de proliferação contínua, insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento, habilidade de evasão da morte celular programada (apoptose) e do sistema imune, capacidade de desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese), desregulação do metabolismo energético, instabilidade genômica e capacidade de invadir tecidos e provocar metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O estudo aprofundado destas características contribui para um maior conhecimento a cerca do tumor e para o estabelecimento de possíveis alvos terapêuticos. Neste trabalho, focaremos nas alterações metabólicas que ocorrem no tumor e que são necessárias para o crescimento do mesmo.

1.2.1 Metabolismo energético

O metabolismo da glicose, o macronutriente central, permite que a energia seja aproveitada na forma de ATP através da oxidação de suas ligações de carbono, conhecida como glicólise (LIBERTI; LOCASALE, 2016). Além disso, a glicólise produz intermediários para outras vias, alimentando as vias de biossíntese de ácidos graxos, aminoácidos e colesterol, entre outras (DEBERARDINIS et al., 2008).



Figura 2: Características importantes apresentadas por células tumorais para a transformação maligna. Adaptado de HANAHAN e WEINBERG, 2011.

Como as células tumorais tem a capacidade de proliferar de maneira descontrolada, elas consomem uma quantidade de nutrientes muito maior do que um tecido saudável. A fim de garantir esse aporte energético, as células sofreram adaptações metabólicas. Uma destas adaptações foi observada pela primeira vez pelo pesquisador Otto Warburg, que descreveu que, independente da presença de oxigênio, as células tumorais podem reprogramar seu metabolismo de glicose e, assim, sua produção de energia, limitando seu metabolismo energético em grande parte para a via glicolítica. Este estado foi determinado Efeito Warburg ou glicólise aeróbica (WARBURG, 1930, 1956a, 1956b) (**Figura 3**).

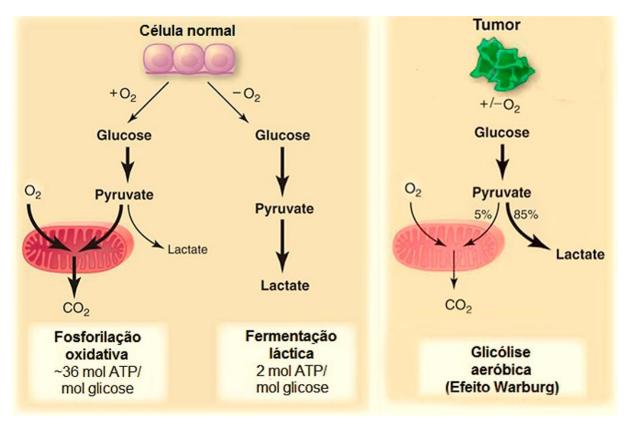


Figura 3: Efeito Warburg: da glicose ao piruvato. Células normais (diferenciadas) são reguladas pela concentração de oxigênio no microamibiente. Células tumorais e/ou em estado proliferativo perdem a regulação pelo oxigênio. Adaptado de HEIDEN, 2009.

Warburg levantou a hipótese de que as células tumorais teriam um metabolismo mitocondrial danificado; no entanto, esta hipótese foi descartada, sendo demonstrado que células tumorais podem realizar fosforilação oxidativa mesmo com inibição glicolítica (GATENBY; GILLIES, 2004). Já foi visto que o fluxo glicolítico é 2 a 17 vezes maior em hepatomas de ratos do que em hepatócitos normais, produzindo 18 vezes mais ATP e tornando a glicólise a principal fornecedora de energia para a crescente proliferação dos tumores (CLEVERS, 2011; MARÍN-HERNÁNDEZ et al., 2006). Essa característica foi demostrada por Zu e Guppy (2004), no qual observaram que aprodução de ATP proveniente da glicólise contribui com 78% do ATP gerado no tumor de célula Ehrlich. Outra vantagem de se elevar a taxa glicolítica seria a alta concentração de lactato produzida pela célula tumoral, o que pode suprimir a proliferação de linfócitos T e diminuir sua atividade citotóxica. Esses efeitos podem contribuir para que as células neoplásicas escapem da ação do sistema imunológico (CHANG et al., 2015; HO et al., 2015). Além disso, a glicólise aeróbica proporciona intermediários necessários para vias biossintéticas,

incluindo açúcares de ribose para síntese de nucleotídeos, glicerol e citrato para síntese de lipídeos, aminoácidos não essenciais, e NADPH através da via das pentoses (DEBERARDINIS et al., 2008). Assim, o efeito Warburg beneficia tanto a bioenergética como a biossíntese.

Vários trabalhos já propuseram uma correlação da atividade glicolítica com o grau de malignidade do tumor, de forma que a taxa de glicólise é maior em tumores com crescimento mais acelerado em relação aos tumores de crescimento lento (ZU; GUPPY, 2004). Nosso grupo de pesquisa demonstrou, utilizando três diferentes linhagens de mama humana (MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231), que mesmo quando há uma menor atividade mitocondrial e produção de ATP, o crescimento celular não é comprometido quando se tem uma elevada eficiência glicolítica, e isso pode conferir uma vantagem proliferativa à célula tumoral (ZANCAN et al., 2010). Além disso, o bloqueio desta via pelo fármaco clotrimazol, um potencial fármaco antitumoral, foi capaz de reduzir os níveis de ATP nessas células tanto em condições de normóxia quanto em hipóxia, além de prejudicar o crescimento e a capacidade migratória das linhagens mais agressivas (FURTADO et al., 2015).

1.3 Serotonina (5-Hidroxitriptamina – 5-HT)

A serotonina é uma monoamina, sintetizada em diferentes tecidos incluindo neurônios serotonérgicos no sistema nervoso central, nas células enterocromafins encontradas na mucosa intestinal, plaquetas e mastócitos. Sua síntese ocorre em duas etapas. A enzima triptofano 5-hidroxilase (TPH) catalisa a transformação do triptofano a 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Essa reação é a etapa limitante da síntese e a TPH existe em duas isoformas, TPH1 (expressa principalmente na periferia) e TPH2 (isoforma específica de neurônio). 5-HTP é então descarboxilado pela 5-HTP decarboxilase, para formar finalmente serotonina. Após a biossíntese, a 5-HT é concentrada em compartimentos intracelulares, as vesículas sinápticas nos neurônios, pelo transportador vesicular de monoamina. A serotonina é metabolizada em dois passos enzimáticos para formar o ácido 5-hidróxiindolacético (5-HIAA), o principal produto da degradação de serotonina (**Figura 4**). 5-HIAA será excretado na urina (LAM; HEISLER, 2007; SARROUILHE et al., 2015).

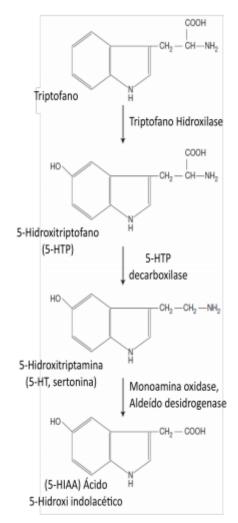


Figura 4: Biossíntese e metabolismo da serotonina. Adaptado de LAM e HEISLER, 2007.

A maior parte da monoamina encontrada no sangue, cerca de 95%, está estocada nas plaquetas. Estas células são os principais transportadores da serotonina no sangue, apresentando um papel importante na coagulação sanguínea (LESURTEL, 2006).

A 5-HT tem sido relacionada a diversas funções no sistema nervoso central (SNC), como desenvolvimento cerebral, ritmo cardíaco, termo regulação, cognição, dor, apetite, entre outras. Além do mais, ela está envolvida com muitos transtornos do SNC e psiquiátricos, como doença de Parkinson, depressão, alucinação, esquizofrenia, bulimia, ansiedade (MARIN et al., 2012).

Sua ação hormonal está relacionada a diversos eventos fisiológicos e patológicos, participando de processos de crescimento e diferenciação celular (RAZ

et al., 2016), podendo promover a regulação da concentração de glicose sanguínea (FISCHER et al., 1995).

A diversidade dos efeitos modulados pela serotonina é explicada pela sua interação com múltiplos receptores, classificados entre as famílias 5-HT1 a 5-HT7, com subseqüente divisão em 14 subtipos (PEROUTKA, 1995). A **Figura 5** apresenta um resumo das principais características das diferentes isoformas dos receptores de serotonina.

Receptor	Proteína G	Sinalização envolvida	Funções gerais
5-HT _{1A}	G _{I/o}	Inibe AC, ativa canais de K [*] , ativa ERK	SNC: hiperpolarização neuronal
5-HT ₁₈	G _{I/o}	Inibe AC, ativa ERK	SNC: inibição da liberação de neurotransmissores
5-HT _{1D}	G _{I/o}	Inibe AC	SNC: inibição da liberação de neurotransmissores
5-HT _{1E}	G _{i/o}	Inibe AC	Não caracterizado
5-HT _{1F}	G _{I/o}	Inibe AC	Não caracterizado
5-HT _{2A}	G_{q}	Ativa PLC, PKC, ERK, PLA ₂	SNC: excitação neuronal Periferia: contração músculo liso, agregação plaquetária
5-HT ₂₈	Gq	Similar ao 5 - HT _{2A}	Motilidade GI
5-HT _{2C}	G_q	Similar ao 5- HT _{2A}	SNC: secreção de fluido cerebroespinhal
5-HT ₃	N/A		Neurônios centrais e periféricos: despolarização
5-HT₄	G _s	Ativa AC e PKA	SNC: excitação neuronal Periferia: motilidade GI, taquicardia
5-HT _{SA}	Descon hecido	Desconhecido	Não caracterizado
5-HT _{sa}	Desconhecido	Desconhecido	Não caracterizado
5-HT ₆	G _s	Ativa AC e PKA	Não caracterizado
5-HT ₇	G_s	Ativa AC e PKA	Não caracterizado

Figura 5: Receptores de serotonina e suas principais características. Adaptado de RUDDELL, 2008.

A **Figura 6** apresenta um resumo dos efetores intracelulares envolvidos na sinalização por serotonina. A maioria dos receptores pertence a uma grande família de receptores classicamente descritos como ligados à proteína G, podendo regular negativamente ou positivamente a adenilato ciclase (AC) (HOYER et al., 1994), além de ser capaz de ativar a fosfolipase C (PLC) e promover hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) (CONN et al., 1986). A única exceção é o receptor 5-HT3, que está associado a canais iônicos.

A serotonina é capaz de promover ativação da proteína quinase C (PKC), dependente de PLC, diacilglicerol (DAG) e do aumento no influxo de Ca²⁺ e de uma quinase regulada por sinal extracelular (ERK 1/2) mediada por PLC-PKC em células de músculo liso uterino (SHUM; MELENDEZ; JEFFREY, 2002). Em células NIH-3T3 de fibroblasto, que expressam o subtipo 5-HT2A do receptor de serotonina, foi demonstrado que este receptor interage com calmodulina (CaM), e essa interação promove diminuição da ligação entre o receptor e a proteína G (TURNER; RAYMOND, 2005).

Eritrócitos humanos respondem a ação da serotonina, que é capaz de ativar a enzima fosfofrutoquinase (PFK), na fração ligada à membrana destas células. O estímulo serotonérgico ainda promoveu aumento no conteúdo de lactato, refletindo ativação da via glicolítica (ASSOULINE-COHEN; BEN PORAT; BEITNER, 1998). Estudos mais recentes do nosso grupo também mostraram que a serotonina regula a atividade de PFK de músculo esquelético de camundongos. Esta ativação depende, por um lado, de uma via de sinalização com a participação da PLC-PKC-Ca²⁺-CaM e calmodulina quinase II (CaMKII) e, por outro, envolve a ação de tirosina quinases (COELHO; COSTA; SOLA-PENNA, 2007; COELHO; SOLA-PENNA, 2013).

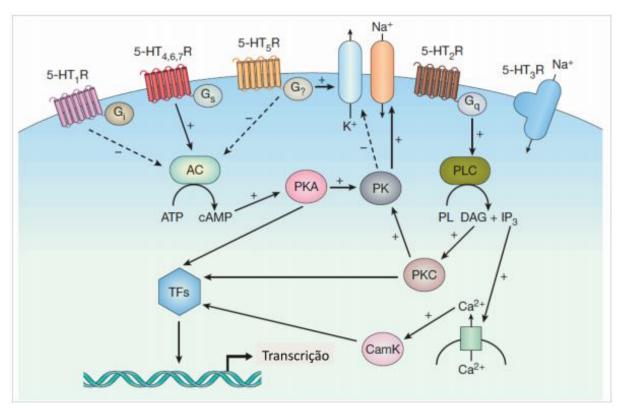


Figura 6: Receptores de serotonina e seus efetores intracelulares. Adaptado de LAM;HEISLER (2007).

1.3.1 Serotonina e câncer

Além de suas funções já bem conhecidas, a 5-HT tem se mostrado um fator mitogênico para vários tipos de câncer, como carcinoma pulmonar (CATTANEO; FESCE; VICENTINI, 1995), pancreático (MAO et al., 1998), hepático (SOLL et al., 2010), epitelial e colo retal (TUTTON; BARKLA, 1982) e câncer de mama (PAI et al., 2009; SONIER et al., 2006)

Sonier et al. (2005) relatou a presença do receptor 5-HT2A em tecido de placenta humana e em linhagens celulares de coriocarcinoma de placenta, JEG-3 e BeWo, apresentando efeito mitogênico quando estimulado. A ativação desta mesma isoforma do receptor em linhagem celular de carcinoma mamário MCF-7, levou ao aumento da taxa proliferativa e viabilidade celular dessa linhagem (SONIER et al., 2006). Embora ainda não se possa estabelecer uma correlação entre a ação da serotonina e a ativação de uma via metabólica bioenergética que possa explicar esses fenômenos, já foi relatada a capacidade da serotonina em aumentar a captação de glicose em músculo esquelético de ratos, através do aumento na

expressão de transportadores de glicose (HAJDUCH et al., 1999), levantando a hipótese de que o aumento do fluxo glicolítico pode, em parte, sustentar as adaptações promovidas pela serotonina, resultando em aumento da viabilidade celular e taxa proliferativa destas células.

Os níveis de serotonina sérica tem se mostrado úteis para o prognóstico de carcinoma urotelial de bexiga, adenocarcinoma de próstata e carcinoma renal (JUNGWIRTH et al., 2008).

A incidência de depressão é muito alta em pacientes com câncer. Antidepressivos, mais especificamente inibidores da recaptação de serotonina, atuam se ligando aos seus transportadores (SERT), acarretando no aumento dos níveis do hormônio nas fendas sinápticas e no plasma (ASHBURY et al., 2012; FRICK et al., 2011). Vários estudos mostraram que elevados níveis de serotonina sistêmica, resultados do uso destes medicamentos, podem contribuir para o crescimento de diferentes tipos de tumor. Foi relatado que a fluoxetina aumenta a proliferação das células de melanoma B16F10 e C3 de fibrocarcinoma, *in vitro* e *in vivo* (BRANDES et al., 1992). CHRISTEN et al. (2016) mostrou que o uso de sertralina, em pacientes com câncer de ovário, promoveu uma aceleração do processo de progressão da doença. Em outro trabalho, foi observado um aumento do risco de morte em pacientes com câncer de mama que fizeram uso do antidepressivo paroxetina (KELLY et al., 2010).

Sendo assim, a investigação de vias de sinalização envolvidas no processo tumorigênico induzido pela serotonina se torna interessante e necessário para o entendimento e planejamento de novas estratégias terapêuticas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da 5-HT sobre o metabolismo energético e sobre a sinalização de células de câncer de mama.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da 5-HT sobre o metabolismo glicolítico:
 - Estudar o consumo de glicose;
 - Estudar a produção de lactato;
 - Estudar a atividade mitocondrial;
 - o Estudar a atividade das principais enzimas glicolítica: HK, PFK e PK.
- Identificar os intermediários metabólicos envolvidos na sinalização pela 5-HT:
 - Estudar a atividade das principais enzimas glicolíticas na presença de inibidores e antagonistas de intermediários das vias de sinalização celular;
 - Estudar a regulação pós-traducional de proteínas envolvidas em vias de sinalização celular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

A linhagem celular de câncer de mama MCF-7 foi obtida no Banco de Células do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ. Meio de cultura DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco) e soro fetal bovino foram obtidos da Gibco-Invitrogen Corporation (EUA). A serotonina e as enzimas para a realização dos ensaios enzimáticos e outros reagentes foram obtidas da Sigma Chemical Co (MA, EUA).

3.2 Cultura de células

As células MCF-7 foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e bicarbonato de sódio (3,7 g/L), pH 7,4 e acondicionadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. O crescimento celular foi devidamente acompanhado por meio de observação em microscópio invertido.

Para os ensaios, as células foram crescidas em placas de cultura até atingirem cerca de 85% de confluência. Posteriormente, o meio foi renovado e a placa mantida com os diferentes tratamentos por tempo adicional na estufa nas mesmas condições de incubação.

3.3 Avaliação do consumo de glicose e produção de lactato

Após o tempo de tratamento, o meio de cultura das placas de 96 poços foi retirado e utilizado para avaliar o consumo de glicose e a produção de lactato como descrito por LEITE et al., 2007 e MEIRA et al., 2005. O conteúdo de glicose que permaneceu no meio de cultura foi mensurado usando o sistema acoplado de enzimas contendo glicose oxidase/peroxidase (Glucox 500, Doles Ltda, GO, Brasil). A produção de lactato foi avaliada calculando o conteúdo de lactato no meio de cultura incubado com as células através de um meio reacional contendo lactato desidrogenase e NAD⁺. A redução do NAD⁺ foi acompanhada através da medida da absorbância em 340 nm no leitor de microplacas Victor 3 (Perkin Elmer, EUA).

3.4 Avaliação da atividade mitocondrial

A atividade mitocondrial foi avaliada pelo ensaio de MTT (brometo de 3,4,5-dimetilazol-2,5-difeniltetrazolium), segundo MOSMANN (1983). O ensaio de MTT é um método colorimétrico quantitativo que se baseia na redução do sal tetrazolium, pelas desidrogenases mitocondriais em cristais de formazan de coloração azul púrpura, que se acumulam somente no citoplasma de células viáveis. Dessa forma, o ensaio de MTT é capaz de avaliar, de maneira indireta, a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

As células foram cultivadas em placas de 96 poços e incubadas na ausência ou na presença de concentrações crescentes de 5-HT. Após o tempo de tratamento, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se 100 µL do reagente de MTT (5 mg/mL em meio de cultura). As placas de cultura contendo essa solução foram mantidas ao abrigo da luz por 3 horas, em estufa a 37°C. Ao final dessa incubação, o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan produzidos foram dissolvidos em 100 µL dedimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância do corante foi medida no comprimento de onda de 560 nm, utilizando-se o leitor de microplacas Victor 3 (Perkin Elmer, EUA).

3.5 Determinação da atividade enzimas glicolíticas HK, PFK-1 e PK

Após o tempo de incubação com os diferentes tratamentos, o meio de cultura foi descartado das placas de 24 poços. As células aderidas foram tripsinizadas, centrifugadas (5000 rpm por 10 minutos) e ressuspendidas em tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,4, e lisadas em N2 líquido. Uma alíquota foi retirada para a quantificação proteica das amostras pela técnica de Lowry (LAMBERT; WEISS; LAUDER, 2001; LOWRY et al., 1951) e a atividade das enzimas medidas pelo método acoplado descrito por SPITZ et al., (2009) e ZANCAN et al., (2010). A quantificação da atividade da HK foi realizada em um meio de reação (MRC) contendo: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl₂, 1 mM glicose, 1 mM NAD⁺, 1 U/mL glicose 6-fosfatodesidrogenase. O MRC para a atividade da PFK contém: 50mM Tris-HCl (pH 7,4), 25 mM MgCl, 5mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM frutose-6-fosfato, 1mM ATP, 1 mM NADH, 2 U/mL aldolase, 4 U/mL triosefosfatoisomerase e 2 U/mL α-glicerofosfatoisomerase. A atividade da PK foi quantificada em MRC contendo: 50

mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl₂, 120 mM KCl, 5 mM ADP, 5 mM fosfoenolpiruvato, 6,6 mM NADH, 22 U/mL LDH. O volume final da reação, em todos os ensaios, foi de 200 μL, (100 μL do meio reacional +100 μL do lisado celular). A reação enzimática foi realizada através da oxidação/redução do NADH/NAD⁺ ou da redução de NADP⁺ pela medida da absorbância em 340 nm no leitor de microplacas Victor 3 (Perkin Elmer, EUA)

3.6 Dosagem do conteúdo de ATP intracelular

As células foram cultivadas em placas de 96 poços e, após a incubação com os diferentes tratamentos, o meio de cultura foi removido e 100 µL da solução de reação preparada do Kit ATP Determination (Molecular Probes® ATP Determination Kit— ThermoFisher, EUA) foram adicionados diretamente sobre as células e incubadas por 15 minutos ao abrigo da luz, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Esse sistema é baseado na reação entre o ATP celular e a enzima luciferase na presença do substrato D-luciferina. A luminescência obtida é proporcional à concentração de ATP celular e foi analisado pelo espectrofotômetro Victor 3 (Perkin Elmer, EUA).

3.7 Imunoblotting

Para uma investigação mais clara das vias de sinalização ativadas pela serotonina, a suplementação do meio de cultura DMEM com SFB foi substituída, neste caso, pelo soro estripado (Charcoal Stripped FBS OneShot – Gibco). Dessa forma, retiramos a interferência de outros hormônios e fatores de crescimento, avaliando apenas os efeitos da serotonina.

Extração de proteínas: As células foram cultivadas em placas de 6 poços e, após chegar a 85% de confluência, o meio de cultura foi trocado pelo meio suplementado com soro estripado e as células ficaram em *starvation overnight*. Após a incubação com os diferentes tratamentos, o meio de cultura foi removido e os poços lavados com tampão fosfato-salino (PBS). As células foram lisadas em tampão RIPA (150 mM NaCl, 20 mM Tris base pH 7,5, Glicerol 10%, 5 mM EGTA, 0,5 mM EDTA, 2 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, triton1%, SDS 0,1%, 80 mM β-glicerofosfato, 5 mM NaPPi, 1 mM PMSF) na presença de inibidores de proteases. A

concentração de proteína das amostras foi realizada pelo método do ácido bicinconínico conforme a descrição do fabricante (Pierce BCA Protein Assay Kit – ThermoScientific, EUA).

Separação das proteínas por SDS-PAGE: As proteínas foram desnaturas a 100°C por 10 minutos em tampão de amostra TEX (Tris base 0,5 M, glicerol, SDS e azul de bromofenol 0,05%) e β-mercaptoetanol 15%. Após esse procedimento, o volume equivalente a 20 μg foi aplicado no gel de poliacrilamida (3,6% para retenção e 9% para separação das proteínas) e as proteínas foram separadas por eletroforese por cerca de 2h a 120 V.

Western blotting: As proteínas separadas por eletroforese foram eletrotransferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (Immobilon-P TranferMembrane EMD, Millipore, EUA). A voltagem foi regulada para 30 V overnight. Ao final da transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S e, em seguida, bloqueadas com leite desnatado 5% p/v em TBS-T (TBS: 50 mM Tris base, 150 mM NaCl; Tween: 0,1% v/v), por 1 hora sob agitação lenta. Posteriormente, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (**Tabela 1**), conforme orientações dos fabricantes, diluídos em TBS-T suplementados com leite desnatado 0,5% p/v e azida 0,002% e mantidos sob agitação a 4°C overnight. As membranas foram, em seguida, incubadas com os seus respectivos anticorpos secundários (**Tabela 1**) por 1 hora sob agitação lenta. Após este período, o sistema foi revelado com o kit Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, EUA).

Tabela 1: Lista dos anticorpos utilizados no trabalho

Anticorpo	Fabricante	Código	Diluição
Anti-pACC	Cell Signaling	#3661	1:1000
Anti-ACC	Cell Signaling	#3662	1:1000
Anti-pAMPK	Cell Signaling	#2535	1:1000
Anti-AMPK	Cell Signaling	#2532	1:1000
Anti-pIRS1	Cell Signaling	#2385	1:1000
Anti-IRS1	Millipore	06-248	1:1000

Anti-pERK1/2	Cell Signaling	#9106	1:1000
Anti-ERK1/2	Cell Signaling	#4695	1:1000
Anti-pmTOR	Cell Signaling	#2971	1:1000
Anti-mTOR	Cell Signaling	#2972	1:1000
Anti-pS6	Cell Signaling	#4858	1:1000
Anti-S6	Cell Signaling	#2217	1:1000
Anti-pPKC	Cell Signaling	#9379	1:1000
Anti-PKC	Cell Signaling	#2058	1:1000
Anti-pCREB	Cell Signaling	#9196	1:1000
Anti-CREB	Cell Signaling	#9197	1:1000
Anti-Mouse	Jackson Laboratories	155-035-146	1:10000
Anti-Rabbit	Jackson Laboratories	111-035-144	1:20000

3.8 Análise estatística dos resultados

As análises estatísticas e as regressões não lineares foram realizadas através do aplicativo GraphPadPrism 6. O teste t de *Student* foi utilizado. Os valores de p \leq 0,05 foram usados para considerar os valores das médias estatisticamente diferentes.

4. RESULTADOS

A linhagem celular MCF-7 é proveniente de adenocarcinoma mamário humano e pode ser classificada como uma linhagem tumoral de alta capacidade proliferativa (derivada de sítio metastático *in vivo*), sendo assim, utilizada largamente como modelo *in vitro* para estudo do metabolismo do câncer de mama (FURTADO et al., 2015; ZHANG et al., 2016)

Portanto, a linhagem MCF-7 foi utilizada como modelo de câncer de mama em todos os experimentos realizados neste trabalho.

4.1 Efeitos da 5-HT no perfil metabólico

Nosso objetivo inicial foi avaliar os efeitos da serotonina sobre os parâmetros metabólicos da célula tumoral. Para isso, nós incubamos as células com diferentes concentrações do hormônio (0; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 µM) por 30 minutos.

Observamos um aumento da captação de glicose (Figura 7A) e da produção de lactato (Figura 7B) por essa célula. Como já apresentado na introdução, a eficácia da conversão de glicose a lactato (eficiência glicolítica) pode conferir uma vantagem proliferativa à célula tumoral. Pela Figura 7C, podemos observar que a eficiência glicolítica, na presença de 5-HT está diminuindo. Entretanto, essa redução está sendo compensada com o aumento do metabolismo mitocondrial (Figura 7). Este resultado sugere que pode estar ocorrendo um desvio do metabolismo glicolítico para oxidativo.

A partir da análise destes resultados, selecionamos a concentração de 5-HT 10 µM para a realização dos ensaios posteriores.

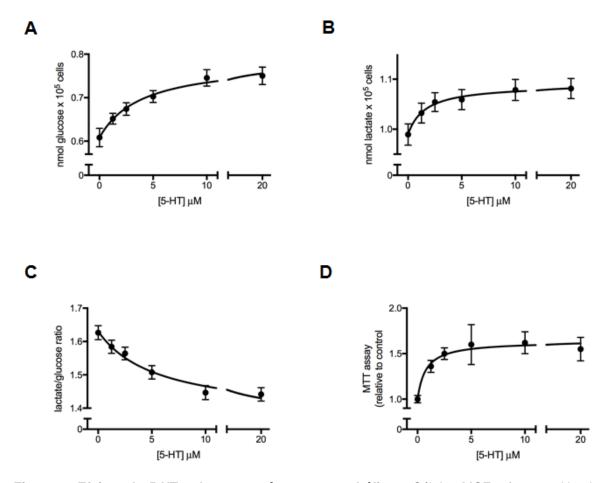


Figura 7: Efeitos da 5-HT sobre os parâmetros metabólicos. Células MCF-7 foram cultivadas e tratadas em placa de 96 poços, na ausência ou na presença de diferentes concentrações de 5-HT (0; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 μ M). O perfil metabólico foi avaliado após 30 minutos de tratamento, através das quantificações da captação de glicose (A), produção de lactato (B), eficiência glicolítica (C) e atividade mitocondrial (D). Gráficos representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em quadruplicata (n=3).

4.2. Efeitos da 5-HT na atividade das enzimas HK, PFK e PK

Uma vez que o estimulo serotonérgico leva ao aumento da captação celular de glicose (**Figura 7A**), o próximo passo foi investigar a ação da 5-HT sobre o controle da atividade das principais enzimas que catalisam as três etapas irreversíveis da glicólise e que, portanto, determinam a taxa do fluxo glicolítico.

O tratamento das células com 5-HT por 30 minutos promoveu um aumento da atividade das três enzimas (**Figura 8** - barras pretas), sugerindo que o estímulo com o hormônio em células MCF-7 é capaz de aumentar o fluxo glicolítico através do

controle positivo de enzimas chaves da glicólise, o que pode estar correlacionado ao aumento da viabilidade promovido pela 5-HT nesta linhagem celular.

4.3 Avaliação dos possíveis intermediários da sinalização celular pela 5-HT

Na tentativa de entender os possíveis mecanismos de ação da 5-HT na modulação positiva da atividade das enzimas glicolíticas, realizamos os mesmos ensaios de atividade, conduzidos com diferentes inibidores e antagonistas, seletivos de intermediários das vias de sinalização, na presença e ausência da 5-HT por 30 minutos.

Inicialmente, confirmamos que os efeitos observados eram, de fato, devido à ligação da serotonina ao seu receptor, uma vez que a modulação da atividade das enzimas foi revertida na presença da ketanserina, antagonista de alguns receptores acoplados a proteína G (**Figura 8**).

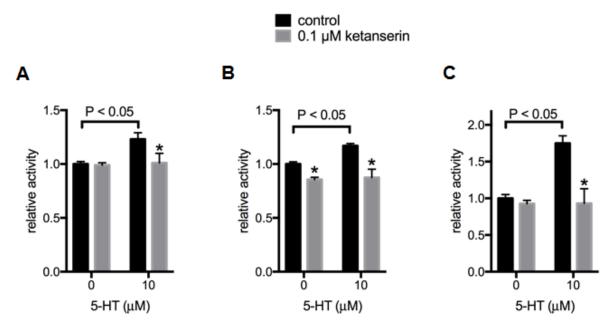


Figura 8: Quantificação das atividades enzimáticas na presença de ketanserina. Células MCF-7 foram tratadas, na ausência ou na presença de 5-HT (10 μ M) e na ausência ou presença de ketanserina (0,1 μ M), antagonista do receptor 5-HT2. A atividade da HK (A), PFK (B) e PK (C) foram determinadas após 30 minutos de incubação. Gráficos representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em quadruplicata (n=3). * P < 0,05 Student's t-test.

Como citado anteriormente, resultados prévios de Coelho e Sola-Penna (2013) mostraram que a serotonina estimula a atividade da PFK de músculo esquelético de camundongo, através da via PLC-PKC-CaMK II. Desta forma, avaliamos se o mesmo mecanismo seria observado em nosso modelo.

Na **Figura 9**, observamos que a exposição das células ao inibidor de PLC, U73122, evitou a ativação da HK e da PFK desencadeada pela serotonina. Entretanto, o efeito sobre a PK mostrou-se independente de PLC (**Figura 9C**). Além disso, tanto a presença de do composto 48/80, antagonista de calmodulina (**Figura 10**), quanto de genisteína, inibidor de tirosinas quinases (**Figura 11**), foi capaz de reverter o efeito positivo promovido pela 5-HT sobre a atividade das enzimas PFK e PK. Curiosamente, estes compostos não exerceram efeito sobre a ativação da enzima HK (**Painel A**).

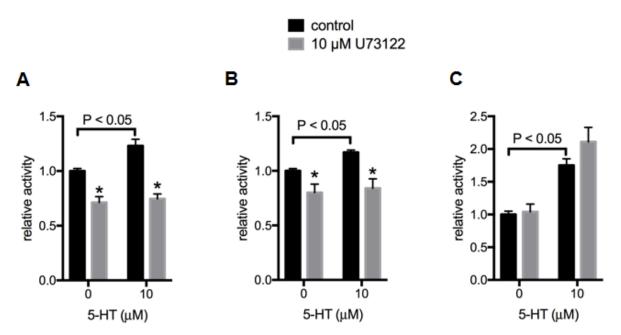


Figura 9: Quantificação das atividades enzimáticas na presença de U73122. Células MCF-7 foram tratadas, na ausência ou na presença de 5-HT (10 μ M) e na ausência ou presença de U73122 (10 μ M), inibidor de PLC. A atividade da HK (A), PFK (B) e PK (C) foram determinadas após 30 minutos de incubação. Gráficos representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em quadruplicata (n=3). * P < 0,05 Student's t-test.

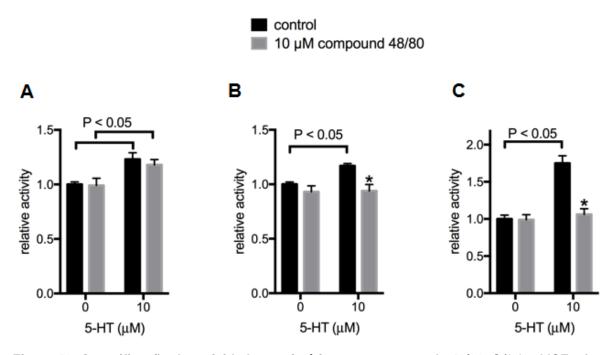


Figura 10: Quantificação das atividades enzimáticas na presença de 48/80. Células MCF-7 foram tratadas, na ausência ou na presença de 5-HT (10 μ M) e na ausência ou presença de 48/80 (10 μ M), antagonista de calmodulina. A atividade da HK (A), PFK (B) e PK (C) fora foram determinadas após 30 minutos de incubação. Gráficos representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em quadruplicata (n=3). * P < 0,05 Student's t-test.

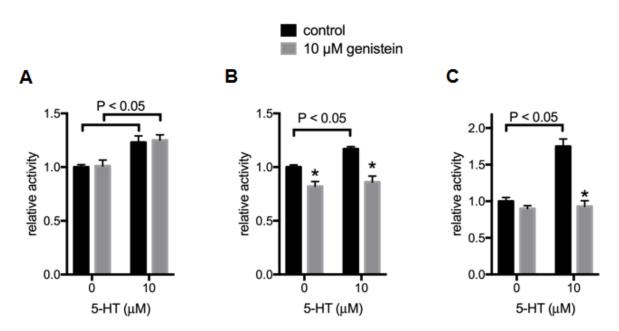


Figura 11: Quantificação das atividades enzimáticas na presença de genisteína. Células MCF-7 foram tratadas, na ausência ou na presença de 5-HT (10 μ M) e na ausência ou presença de genisteína (10 μ M), inibidor de tirosinas quinases. A atividade da HK (A), PFK (B) e PK (C) foram determinadas após 30 minutos de incubação. Gráficos representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em quadruplicata (n=3). * P < 0,05 Student's t-test.

Para confirmar a participação da PKC nos efeitos promovidos pela serotonina, nós incubamos as células com BIS I, um inibidor de PKC. A presença de BIS I preveniu a ativação da HK e PFK, mas não da PK (**Figura 12**).

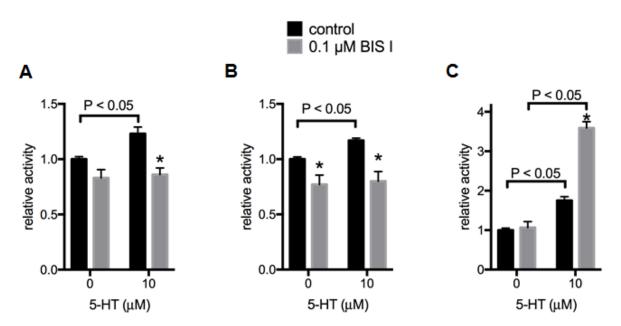


Figura 12: Quantificação das atividades enzimáticas na presença de Bis I. Células MCF-7 foram tratadas, na ausência ou na presença de 5-HT (10 μ M) e na ausência ou presença de Bis I (0,1 μ M), inibidor de PKC. A atividade da HK (A), PFK (B) e PK (C) foram foram determinadas após 30 minutos de incubação. Gráficos representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em quadruplicata (n=3). * P < 0,05 Student's t-test.

Esse conjunto de resultados corrobora os dados observados previamente em músculo esquelético (COELHO; SOLA-PENNA, 2013).

Uma vez observada a participação de PKC, investigamos o envolvimento de MEK e ERK, dois efetores desta via. A inibição destes intermediários, utilizando PD98059 (inibidor de MEK) e U0126 (inibidor de ERK), reverteu os efeitos modulados pela 5-HT apenas sobre a atividade da PFK e não sobre as outras enzimas glicolíticas. (**Figuras 13 e 14**).

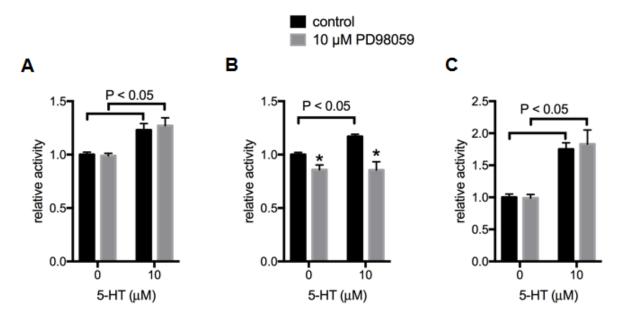


Figura 13: Quantificação das atividades enzimáticas na presença de PD98059. Células MCF-7 foram tratadas, na ausência ou na presença de 5-HT (10 μ M) e na ausência ou presença de PD98059 (10 μ M), inibidor de MEK. A atividade da HK (**A**), PFK (**B**) e PK (**C**) foram determinadas após 30 minutos de incubação. Gráficos representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em quadruplicata (n=3). * P < 0,05 Student's t-test.

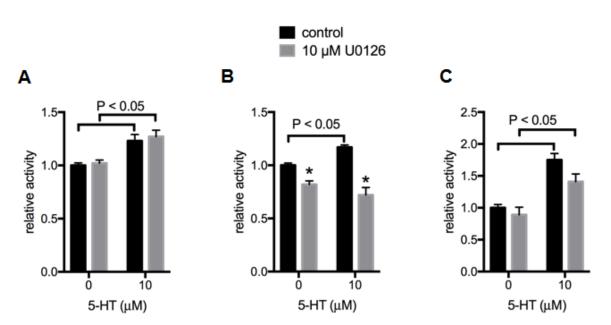


Figura 14: Quantificação das atividades enzimáticas na presença de U0126. Células MCF-7 foram tratadas, na ausência ou na presença de 5-HT (10 μ M) e na ausência ou presença de U0126 (10 μ M), inibidor de ERK. A atividade da HK (A), PFK (B) e PK (C) foram determinadas após 30 minutos de incubação. Gráficos representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em quadruplicata (n=3). * P < 0,05 Student's t-test.

Os receptores de serotonina acoplados a proteína G podem ativar a AC, aumentando assim os níveis de AMPc e resultando na ativação da proteína quinase A (PKA), que pode estar envolvida na atividade da serotonina. Para determinar se PKA é crucial para os efeitos observados, as células foram tratadas com H-89, um inibidor de PKA, e a atividade das enzimas foi quantificada. Esta inibição reverteu completamente os efeitos desencadeados pela serotonina nas três enzimas (**Figura 15**).

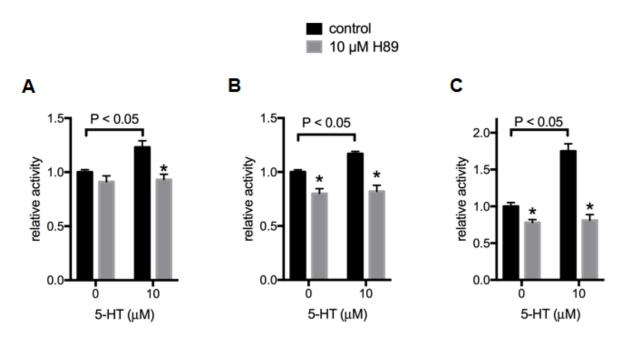


Figura 15: Quantificação das atividades enzimáticas na presença de H89. Células MCF-7 foram tratadas, na ausência ou na presença de 5-HT (10 μ M) e na ausência ou presença de H89 (10 μ M), inibidor de PKA. A atividade da HK (A), PFK (B) e PK (C) foram determinadas após 30 minutos de incubação. Gráficos representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em quadruplicata (n=3). * P < 0,05 Student's t-test.

4.4 Avaliação das vias de sinalização celular ativadas pela 5-HT

Pelos resultados anteriores, conseguimos observar o envolvimento de alguns intermediários da sinalização pela 5-HT. No próximo passo, realizamos análises de imunoblotting para avaliar a ativação de possíveis vias relacionadas àqueles intermediários.

Objetivando confirmar o envolvimento de PKC na ação da 5-HT (**Figura 12**), avaliamos a regulação pós-traducional desta proteína, na presença e ausência do hormônio. Na **Figura 16**, podemos observar que a 5-HT promoveu um aumento da fosforilação e, consequentemente, da ativação da PKC. Neste ensaio foi utilizado um anticorpo pan-p-PKC, o que não nos permite discutir a isoforma desta enzima. Seguindo os efetores subsequentes da via, observamos também a ativação do fator de transcrição celular CREB. A ativação tanto de PKC quanto de CREB está relacionada com vias de sobrevivência (SAKAMOTO; FRANK, 2009; XIA; FORMAN; FALLER, 2007).

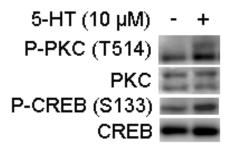


Figura 16: Análise dos perfis proteicos na presença de 5-HT. Células MCF-7 foram tratadas, na ausência ou na presença de 5-HT. O padrão de fosforilação de PKC e CREB foi determinado após 15 minutos de incubação.

A insulina é essencial para a regulação do metabolismo energético e sua sinalização está relacionada ao crescimento e diferenciação celular. Para avaliar o envolvimento dessa via na sinalização pela 5-HT, realizamos o ensaio de imunoblotting na presença deste fator de crescimento e de wortmanina, inibidor de um de seus principais intermediários intracelulares, PI3K.

O tratamento com wortmanina na presença de 5-HT, diminuiu tanto a fosforilação quanto a expressão de Erk 1/2 e praticamente anulou a fosforilação de Akt. Estes efeitos foram parcialmente revertidos na presença concomitante de insulina. Foi possível observar também, que a 5-HT, por si só, não alterou a fosforilação de mTOR e S6 (**Figura 17**).

A 5-HT promoveu um aumento da fosforilação de Erk 1/2, corroborando os resultados de atividade (**Figuras 13 e 14**), e da fosforilação no resíduo Ser 1101 do

IRS1. Esta fosforilação do IRS1 tem um efeito inibitório na via insulínica, o que pode ser constatado através da diminuição da fosforilação de Akt, Erk 1/2 e S6, quando temos a presença dos dois hormônios, comparado ao tratamento com a insulina (**Figura 17**).

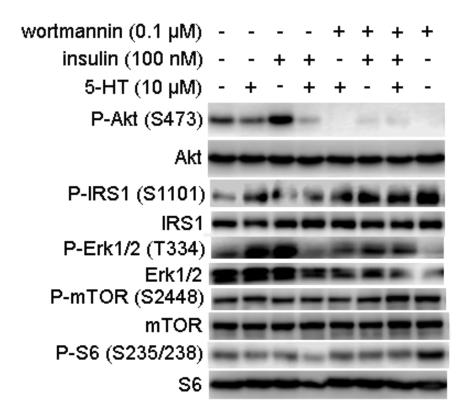


Figura 17: Análise dos perfis proteicos na presença de 5-HT, wortmanina e insulina. Células MCF-7 foram tratadas, na ausência ou na presença de 5-HT, insulina e wortmanina, inibidor de PI3K. O padrão de fosforilação das proteínas foi determinado após 15 minutos de incubação.

A serotonina promoveu uma diminuição da fosforilação de Akt, provavelmente devido à ativação de PKA. Sabe-se que esta quinase fosforila IRS1, entretanto essa fosforilação é inespecífica, não possuindo nenhum resíduo alvo específico. Para investigar essa possibilidade, analisamos a fosforilação de Akt na presença de IBMX, um ativador de PKA. Ao analisar a **Figura 18**, notamos que o estímulo de PKA inibiu a fosforilação de Akt, bloqueando a sinalização de insulina. Portanto, pode ser que a serotonina esteja interferindo na sinalização insulínica via PKA.

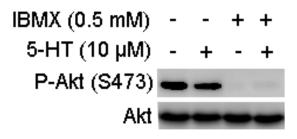


Figura 18: Análise dos perfis proteicos na presença de 5-HT e IBMX. Células MCF-7 foram tratadas, na ausência ou na presença de 5-HT e IBMX, ativador de PKA. O padrão de fosforilação de Akt foi determinado após 30 minutos de incubação.

Continuando a investigação da sinalização da 5-HT, repetimos alguns tratamentos e realizamos novos com dorsomorfina e AICAR, sozinhos e combinados, com 5-HT.

Como observado na **Figura 19**, a 5-HT promoveu um aumento na fosforilação da ACC. Esta fosforilação pode ser devido à ativação ou de PKA ou de AMPK, de maneira independente de fosforilação.

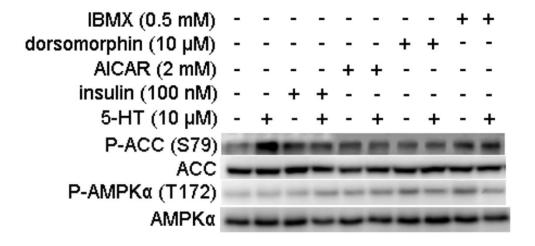


Figura 19: Análise dos perfis proteicos na presença de 5-HT, IBMX, dorsomorfina, AICAR e insulina. Células MCF-7 foram tratadas, na ausência ou na presença dos compostos sozinhos e/ou combinados (IBMX: ativador de PKA; dorsomorfina: inibidor de AMPK e AICAR: ativador de AMPK). O padrão das proteínas foi determinado após 15 minutos de incubação.

Para investigar esta ativação realizamos um ensaio de quantificação de ATP, uma vez que ela está diretamente relacionada ao aporte energético, na presença dos mesmos tratamentos.

As células tratadas apenas com a 5-HT apresentaram um conteúdo de ATP bem inferior em relação à célula não tratada (**Figura 19**). Este estresse energético vai ativar AMPK através de sua mudança conformacional promovida pela ligação de AMP (ou ADP) em seus sítios regulatórios.

Como era de se esperar, AICAR promoveu um aumento na produção de ATP, mesmo em relação ao controle sem estímulo serotonérgico, indiferente da presença ou ausência de 5-HT. A inibição de AMPK não alterou o conteúdo em relação ao controle e quando adicionamos 5-HT, vemos apenas o efeito do hormônio.

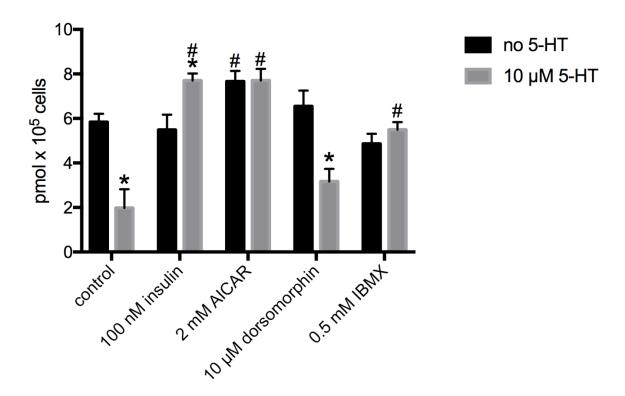


Figura 20: Quantificação do conteúdo de ATP intracelularna presença de 5-HT, insulina, AICAR, dorsomorfina e IBMX. Células MCF-7 foram tratadas, na ausência ou na presença dos compostos por 15 minutos. (IBMX: ativador de PKA; dorsomorfina: inibidor de AMPK e AICAR: ativador de AMPK). Gráficos representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes, realizados em quadruplicata (n=3). * P < 0,05 comparado ao tratamento sem o estímulo de 5-HT dentro de cada condição. * P < 0,05 comparado ao controle com o estímulo de 5-HT. Student's t-test.

5. DISCUSSÃO

Já havia sido descrita a capacidade da serotonina em promover aumento da captação de glicose através de uma via de sinalização distinta daquela descrita para a ação da insulina sobre o influxo de glicose (HILAKIVI-CLARKE; WRIGHT; LIPPMAN, 1993; HAJDUCH, 1996), assim como seu efeito positivo na viabilidade celular de linhagem de câncer de mama (SONIER et al., 2006). Entretanto, não havia sido investigado se esses efeitos ocorrem concomitantemente ao aumento do metabolismo de glicose através da via glicolítica. Nossos resultados mostraram que a serotonina é capaz de aumentar o fluxo glicolítico, em células MCF-7, através do controle das três principais enzimas desta via bioenergética, a HK, PFK e PK.

Apesar disto, a eficiência glicolítica da célula diminuiu na presença de 5-HT. O maior valor possível de eficiência glicolítica (2 mol/mol) representaria a conversão, de forma integral, da glicose captada pela célula a lactato. Nosso grupo demonstrou uma correlação entre a eficiência glicolítica e a agressividade celular em linhagens de mama (ZANCAN et al., 2010). O aumento da captação de glicose sem o aumento da eficiência glicolítica, como mostrado em nossos resultados, pode ser devido ao desvio de esqueleto de carbono da glicose para outras vias de biossíntese, como a de síntese de lipídeos, nucleotídeos e aminoácidos, o que seria condizente com uma célula em estado proliferativo. A parte energética estaria sendo suprida pelo metabolismo mitocondrial, como também observamos pelo ensaio de ATP.

Os intermediários da modulação positiva da serotonina na atividade das principais enzimas glicolíticas foram determinados através do tratamento com inibidores, ativadores e antagonistas. Quando ativados pela presença de serotonina, os receptores acoplados a proteína G, ativam a PLC, clivando um fosfolipídeo em DAG e inositol1,4,5-trifosfato (IP3). DAG vai ativar PKC, capaz de ativar outras proteínas quinases. O IP3 atua liberando Ca²⁺ de estoques internos, capazes de ativar a quinase dependente de calmodulina (LAM; HEISLER, 2007).

Intracelularmente, a PKC está entre as quinases citosólicas que se relacionam positivamente com o fator de transcrição CREB, através de sua fosforilação (MAO; TANG; WANG, 2007), como foi observado em nossos resultados. A ativação de CREB está relacionada ao controle de proteínas relacionadas com proliferação celular (**Figura 21**).

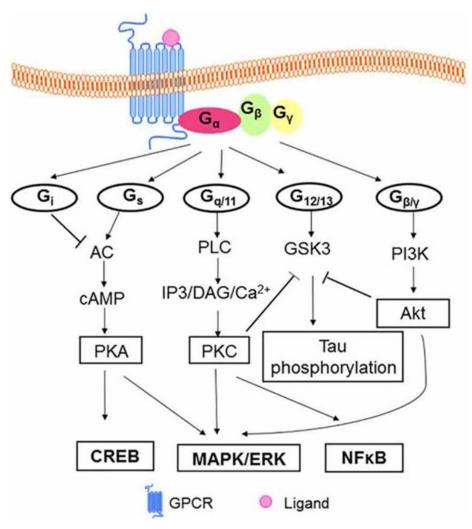


Figura 21: Cascata de sinalização de receptor acoplados a proteína G, culminando na ativação de MAPK e CREB. Adaptado de ZHAO, 2016.

A cascata de sinalização da via de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) se encontra comumente mutada em tumores, controlando processos celulares fundamentais como crescimento, proliferação, diferenciação e migração (DHILLON et al., 2007; WADA; PENNINGER, 2004). Esta superfamília de quinases é composta por três tipos de proteínas sinalizadoras, p38, Erk, Jnk e cada uma destas proteínas é ativada por fosforilação (COLAVITTI; FINKEL, 2005). O estímulo com serotonina promoveu um aumento da fosforilação de Erk 1/2. Segundo SCHMITT (2000), receptores acoplados a proteína G ativam Erk 1/2 através fosforilação e ativação de Raf-1 promovida diretamente pela PKC (Figura 21).

A serotonina vai promover uma diminuição na via de Akt, provavelmente através da interferência com a sinalização de insulina, via aumento da fosforilação

de IRS-1 na S1101. Esta fosforilação pode ser mediada por PKA, uma vez que a presença de promove o completo bloqueio da fosforilação de Akt.

A PKA é ativada pelo aumento dos níveis de AMPc, provocado pela ativação da AC, através de receptores acoplados a proteína G, como alguns receptores de 5-HT (GRUEB et al., 2012). Confirmamos essa ativação através do aumento da fosforilação de ACC, ficando em sua forma inativa, na presença de serotonina.

A partir dos dados obtidos neste trabalho, nós podemos sugerir que a serotonina vai interferir na sinalização da insulina, através da fosforilação de IRS1 que possivelmente está ocorrendo pela ativação de PKA.

Ao analisarmos os resultados da quantificação de ATP intracelular, vimos que, na presença de 5-HT, a célula apresenta baixa energética, uma vez que os processos anabólicos, indispensáveis para a proliferação celular, estão exacerbados. Isto pode ativar a via oxidativa promovendo um aumento da atividade mitocondrial, como observado. Nesta situação, a célula tumoral está se tornando mais oxidativa. Esta redução no conteúdo de ATP intracelular também vai ativar AMPK, através da mudança conformacional desta enzima pela ligação ao AMP, e promover o aumento de fosforilação de ACC.

A AMPK é usualmente descrita como uma proteína sensora do metabolismo energético, inibindo vias anabólicas e ativando vias catabólicas na situação de baixos níveis de ATP (HINDUPUR; GONZÁLEZ; HALL, 2015). Assim, ela tem sido muito estudada como um alvo terapêutico para o tratamento de diferentes tipos de câncer (LI et al., 2015). Entretanto, CHAUBE (2015) mostrou que a ativação de AMPK pode estar relacionada com a biogênese mitocondrial e sobrevivência de células tumorais.

De maneira resumida, nossos resultados indicam que serotonina vai promover a ativação de vias de sinalização relacionadas com a proliferação e sobrevivência celular. Entretanto, contrapondo-se a sinalização induzida por insulina. Contudo, dados não mostrados aqui mostram que a estimulação da linhagem tumoral MCF-7 com 10 μM de serotonina e 100 nM de insulina promove uma potencialização dos efeitos serotoninérgicos sob a atividade das enzimas glicolíticas.

6. CONCLUSÕES

Com os dados apresentados até o momento, é possível inferir que:

- A serotonina promove um aumento da viabilidade celular, da captação de glicose e da produção de lactato em MCF-7;
- A serotonina modula positivamente a atividade da HK, PFK e PK;
- A ativação das enzimas depende, por um lado, de uma via de sinalização com a participação da PLC-PKC-CaM. Por outro lado, envolve a ação de tirosina quinases e PKA.
- A serotonina vai ativar vias relacionadas com proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, como PKC-MAPK-CREB e PKA-CREB;
- A serotonina interfere negativamente na sinalização insulínica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHBURY, J. E. et al. Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI) Antidepressants, Prolactin and Breast Cancer. **Frontiers in oncology**, v. 2, n. December, p. 1–9, 2012.

ASSOULINE-COHEN, M.; BEN PORAT, H.; BEITNER, R. Activation of membrane skeleton-bound phosphofructokinase in erythrocytes induced by serotonin. **Mol.Genet.Metab**, v. 63, n. 3, p. 235–238, 1998.

BRANDES, L. J. et al. Stimulation of Malignant Growth in Rodents by Antidepressant Drugs at Clinically Relevant Doses. **Cancer Research**, v. 52, n. 13, p. 3796–3800, 1992.

CATTANEO, M. G.; FESCE, R.; VICENTINI, L. M. Mitogenic effect of serotonin in human small cell lung carcinoma cells via both 5-HT1A and 5-HT1D receptors. **European journal of pharmacology**, v. 291, n. 2, p. 209–11, 1995.

CHANG, C. et al. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. **Cell**, v. 162, n. 6, p. 1229–1241, set. 2015.

CLEVERS, H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. **Nature medicine**, v. 17, n. 3, p. 313–9, 2011.

COELHO, W. S.; COSTA, K. C.; SOLA-PENNA, M. Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 92, n. 4, p. 364–370, dez. 2007.

COELHO, W. S.; SOLA-PENNA, M. Serotonin regulates 6-phosphofructo-1-kinase activity in a PLC-PKC-CaMK II- and Janus kinase-dependent signaling pathway. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 372, n. 1–2, p. 211–220, 2013.

COLAVITTI, R.; FINKEL, T. Reactive oxygen species as mediators of cellular senescence. **IUBMB life**, v. 57, n. 4–5, p. 277–281, 2005.

CONN, P. J. et al. A unique serotonin receptor in choroid plexus is linked to phosphatidylinositol turnover. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 11, p. 4086–8, 1986.

DEBERARDINIS, R. J. et al. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 1, p. 11–20, 2008.

DHILLON, A. S. et al. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3279–90, 2007.

FINGER, E. C.; GIACCIA, A. J. Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 29, n. 2, p. 285–293, 15 jun. 2010.

FISCHER, Y. et al. 5-Hydroxytryptamine Stimulates Glucose Transport in Cardiomyocytes Via a Monoamine Oxidase-Dependent Reaction. **Biochem J**, v. 311

(Pt 2, p. 575–583, 1995.

FRICK, L. R. et al. Oral administration of fluoxetine alters the proliferation/apoptosis balance of lymphoma cells and up-regulates T cell immunity in tumor-bearing mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 659, n. 2–3, p. 265–272, 2011.

FURTADO, C. M. et al. Phosphatidylinositol-3-kinase as a putative target for anticancer action of clotrimazole. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 62, p. 132–141, 2015.

GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 11, p. 891–899, 2004.

GRUEB, M. et al. Serotonin (5-HT7) receptor-stimulated activation of cAMP-PKA pathway in bovine corneal epithelial and endothelial cells. **Ophthalmic Research**, v. 48, n. 1, p. 22–27, 2012.

HAJDUCH, E. et al. Serotonin (5-Hydroxytryptamine), a novel regulator of glucose transport in rat skeletal muscle. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 19, p. 13563–8, 1999.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HILAKIVI-CLARKE, L.; WRIGHT, A.; LIPPMAN, M. E. DMBA-induced mammary tumor growth in rats exhibiting increased or decreased ability to cope with stress due to early postnatal handling or antidepressant treatment. **Physiology and Behavior**, v. 54, n. 2, p. 229–236, 1993.

HINDUPUR, S. K.; GONZÁLEZ, A.; HALL, M. N. The Opposing Actions of Target of Rapamycin and AMP-Activated Protein Kinase in Cell Growth Control. 2015.

HO, P.-C. et al. Phosphoenolpyruvate Is a Metabolic Checkpoint of Anti-tumor T Cell Responses. **Cell**, v. 162, n. 6, p. 1217–1228, set. 2015.

HOYER, D. et al. International Union of Pharmacology Classification of Receptors for 5-Hydroxytryptamine (Serotonin). **Pharmacological reviews**, v. 46, n. 2, p. 157–203, 1994.

HUNTER, K. W.; CRAWFORD, N. P.; ALSARRAJ, J. Mechanisms of metastasis. **Breast Cancer Research**, v. 10, n. S1, p. S2, 9 fev. 2008.

JUNGWIRTH, N. et al. Serotonin used as prognostic marker of urological tumors. **World Journal of Urology**, v. 26, n. 5, p. 499–504, 2008.

KELLY, C. M. et al. Selective serotonin reuptake inhibitors and breast cancer mortality in women receiving tamoxifen: a population based cohort study. **BMJ** (Clinical research ed.), v. 340, p. c693, 2010.

LAM, D. D.; HEISLER, L. K. Serotonin and energy balance: molecular mechanisms and implications for type 2 diabetes. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 9, n. 5, p. 1–24, 2007.

- LAMBERT, H. W.; WEISS, E. R.; LAUDER, J. M. Activation of 5-HT receptors that stimulate the adenylyl cyclase pathway positively regulates IGF-I in cultured craniofacial mesenchymal cells. **Developmental Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 70–77, 2001.
- LESURTEL, M. Platelet-Derived Serotonin Mediates Liver Regeneration. **Science**, v. 312, n. 5770, p. 104–107, 7 abr. 2006.
- LI, W. et al. Targeting AMPK for cancer prevention and treatment. **Oncotarget**, v. 6, n. 10, p. 7365–78, 2015.
- LIBERTI, M. V; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Bene fit Cancer Cells? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 211–218, 2016.
- MAO, C. et al. Carcinoid Tumors of the Pancreas. **International Journal of Pancreatology**, v. 23, n. 2, p. 153–164, 1998.
- MAO, L.-M.; TANG, Q.; WANG, J. Q. Protein kinase C-regulated cAMP response element-binding protein phosphorylation in cultured rat striatal neurons. **Brain research bulletin**, v. 72, n. 4–6, p. 302–8, 2007.
- MARÍN-HERNÁNDEZ, A. et al. Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells: Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. **FEBS Journal**, v. 273, n. 9, p. 1975–1988, 2006.
- MARIN, P. et al. 5-HT Receptor-Associated Protein Networks: New Targets for Drug Discovery in Psychiatric Disorders? **Current Drug Targets**, v. 13, n. 1, p. 28–52, 2012.
- PAI, V. P. et al. Altered serotonin physiology in human breast cancers favors paradoxical growth and cell survival. **Breast cancer research: BCR**, v. 11, n. 6, p. R81, 2009.
- PEROUTKA, S. J. 5-HT receptors: past, present and future. **Trends in Neurosciences**, v. 18, n. 2, p. 68–69, fev. 1995.
- RAZ, L. et al. Differential effects of hormone therapy on serotonin, vascular function and mood in the KEEPS. **Climacteric**, v. 19, n. 1, p. 49–59, 2016.
- SAKAMOTO, K. M.; FRANK, D. A. CREB in the Pathophysiology of Cancer: Implications for Targeting Transcription Factors for Cancer Therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 8, p. 2583–2587, 7 abr. 2009.
- SHUM, J. K.; MELENDEZ, J. A.; JEFFREY, J. J. Serotonin-induced MMP-13 production is mediated via phospholipase C, protein kinase C, and ERK1/2 in rat uterine smooth muscle cells. **J.Biol.Chem.**, v. 277, n. 0021–9258 (Print) LA-eng PT–Journal Article RN-0 (Enzyme Inhibitors) RN-0 (Estrenes) RN-0 (Isoenzymes) RN-0 (Pyrrolidinones) RN-0 (Receptor, Serotonin, 5-HT2A) RN-0 (Receptors, Serotonin) RN-112648-68-7 (1-(6-((3-methoxyestra-1,3,5(10)-t, p. 42830-42840, 2002.
- SOLL, C. et al. Serotonin promotes tumor growth in human hepatocellular cancer. **Hepatology (Hoboken, NJ, U. S.)**, v. 51, n. 4, p. 1244–1254, 2010.

- SONIER, B. et al. The 5-HT2A serotoninergic receptor is expressed in the MCF-7 human breast cancer cell line and reveals a mitogenic effect of serotonin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 343, n. 4, p. 1053–1059, 2006.
- TUTTON, P. J.; BARKLA, D. H. Influence of inhibitors of serotonin uptake on intestinal epithelium and colorectal carcinomas. **British journal of cancer**, v. 46, n. 2, p. 260–5, 1982.
- WADA, T.; PENNINGER, J. M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2838–2849, 2004.
- XIA, S.; FORMAN, L. W.; FALLER, D. V. Protein kinase C?? is required for survival of cells expressing activated p21RAS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 18, p. 13199–13210, 2007.
- ZANCAN, P. et al. Differential expression of phosphofructokinase-1 isoforms correlates with the glycolytic efficiency of breast cancer cells. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 100, n. 4, p. 372–378, 2010.
- ZHANG, H.-Y. et al. In Vitro Effects of HAS-2 Gene Silencing on the Proliferation and Apoptosis of the MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 3–4, p. 807–817, 2016.
- ZU, X. L.; GUPPY, M. Cancer metabolism: Facts, fantasy, and fiction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, n. 3, p. 459–465, 2004.

ESTUDO DESENVOLVIDO NO TEMPO DO TRABALHO

CARDIM PIRES, T. R. et al. Phosphofructokinase-P Modulates P44/42 MAPK Levels in HeLa Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 11, n. October, p. 1–11, 2017.